



**INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
EGAS MONIZ**

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

**O PAPEL DA PORPHYROMONAS GINGIVALIS NAS DOENÇAS
DA CAVIDADE ORAL E SUA RELAÇÃO COM DOENÇAS
SISTÉMICAS**

Trabalho submetido por
André Filipe Pereira de Lemos
para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

junho de 2016



INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

O PAPEL DA PORPHYROMONAS GINGIVALIS NAS DOENÇAS DA CAVIDADE ORAL E SUA RELAÇÃO COM DOENÇAS SISTÉMICAS

Trabalho submetido por
André Filipe Pereira de Lemos
para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

Trabalho orientado por
Professor Doutor Nuno Eduardo Moura dos Santos da Costa Taveira

junho de 2016

Dedicatória

Quero dedicar esta tese à minha avó que sempre me apoiou e que eu gostava que estivesse presente neste momento importante da minha vida. Sei que ela está a olhar por mim e que me ajudará sempre nos bons e maus momentos ao longo da minha vida. Amo-te muito.

Agradecimentos

Quero agradecer em primeiro lugar ao meu professor orientador, professor Nuno Taveira, por me ter dado um grande apoio na confecção desta tese e por me ajudar a desenvolver os meus pontos fracos na escrita. Ao meu avô pois sem ele não era possível aqui chegar. A todos os meus amigos na faculdade que não são muitos mas são os melhores e que sempre me apoiaram e me aturaram ao longo dos últimos anos. Finalmente quero deixar um agradecimento especial para a minha mãe e para a minha namorada que foram os dois grandes pilares deste feito e que me ajudaram e apoiaram em todas as minhas decisões, certas ou erradas, e por tudo o que me ensinaram ao longo da minha vida e tornaram tudo muito mais fácil e alegre fazendo de mim um homem mais forte e feliz – amo-vos muito. Obrigado a todos.

Resumo

A *Porphyromonas gingivalis* é uma bactéria anaeróbia presente na cavidade oral sendo classificada como o agente patogénico chave na sua capacidade de promover a remodelação do microbioma da cavidade oral e, subsequentemente, a doença periodontal.

Porphyromonas gingivalis apresenta diversas características estruturais e funcionais, tais como os fatores que conferem virulência à bactéria, que são responsáveis pela sua proliferação nos tecidos da cavidade oral, invasão dos tecidos epiteliais gengivais e de células do sistema imunitário, sendo também responsáveis pela modulação das respostas imunitárias à infeção local ou sistémica alterando diversas vias de expressão de mediadores inflamatórios.

Sendo uma bactéria patogénica oportunista, e tendo a capacidade de proliferação sistémica, *P. gingivalis* é um potencial mediador na etiologia de uma grande variedade de doenças crónicas com uma base inflamatória como a artrite reumatóide, doenças cardiovasculares, diabetes e, mais recentemente, diversos tipos de cancro orodigestivo.

Para este trabalho de revisão da literatura, a pesquisa bibliográfica foi realizada essencialmente no PubMed e b-on com as seguintes palavras-chave: *Porphyromonas gingivalis*, periodontite, fatores de virulência e sistema imunitário. Foram referenciados 120 artigos dos quais foram selecionados 71 artigos entre 2011 e 2016. Foram ainda consultados artigos anteriores a 2011 por razões históricas e de contextualização de alguns temas.

Palavras-chave: *Porphyromonas gingivalis*, periodontite, fatores de virulência e sistema imunitário

Abstract

Porphyromonas gingivalis is an anaerobic bacterium present in the oral cavity and is classified as the key pathogen in its remodeling ability of the oral microbiome and subsequently periodontal disease.

Porphyromonas gingivalis has several structural and functional characteristics such as bacterial virulence factors, which are responsible for its oral proliferation, gingival epithelial tissue and immune cells invasion. They are also responsible for the local and systemic immune modulation by changing various expression ways of inflammatory mediators.

As an opportunistic pathogenic bacterium, and having the capacity of systemic proliferation, *P. gingivalis* is a potential mediator in the etiology of a variety of chronic diseases with an inflammatory component such as rheumatoid arthritis, cardiovascular diseases, diabetes and more recently various types of orodigestive cancer.

For this review, bibliographical research was carried out mainly in PubMed and b-on with the following keywords: *Porphyromonas gingivalis*, periodontitis, virulence factors and immune system. 120 articles of which 71 were selected between 2011 and 2016. Articles prior to 2011 were consulted for historical reasons and context of some issues.

Keywords: *Porphyromonas gingivalis*, periodontitis, virulence factors and immune system.

Índice

1. Resumo	1
2. Abstract	2
3. Índice de figuras	4
4. Índice de tabelas	6
5. Lista de abreviaturas.....	7
6. Introdução	9
7. <i>Porphyromonas gingivalis</i>	15
7.1. Características gerais.....	15
7.2. Epidemiologia das infeções por <i>P. gingivalis</i>	17
7.2. Colonização da cavidade oral e adesão bacteriana.....	22
7.3. Fatores de virulência.....	25
7.3.1. Cápsula.....	26
7.3.2. LPS.....	27
7.3.3. Proteases.....	31
7.3.4. <i>Pilis comuns</i>	35
7.4. Interação com células epiteliais da mucosa oral.....	36
7.5. Aquisição de nutrientes.....	39
8. Mecanismos de defesa do hospedeiro.....	40
8.2. <i>P. gingivalis</i> e neutrófilos.....	43
9. <i>P. gingivalis</i> e reabsorção óssea.....	46
10. <i>P. gingivalis</i> e as doenças cardiovasculares.....	50
11. <i>P. gingivalis</i> e a artrite reumatoide.....	54
12. <i>P. gingivalis</i> e o Cancro.....	57
13. Tratamento e prevenção.....	59
14. Conclusão.....	64
15. Bibliografia.....	69

Índice de figuras

Figura 1 - Modelo espacial e temporal da colonização bacteriana oral.....	11
Figura 2 - Etapas de evolução da periodontite.....	12
Figura 3 - Complexos microbianos.....	13
Figura 4 - Características morfológicas e culturais da <i>P. gingivalis</i>	16
Figura 5 - Comparação proteica em amostras de cálculo dentário ancestral e moderno.....	18
Figura 6 - Modo de acção da <i>P. gingivalis</i>	22
Figura 7 - Visualização por microscopia CLSM do desenvolvimento do biofilme de <i>P. gingivalis</i> em caldo de soja tripticaseína.....	23
Figura 8 - Interações mutualísticas entre <i>P. gingivalis</i> e diversas bactérias presentes na cavidade oral por microscopia CLSM.....	24
Figura 9 - Constituição da bactéria <i>P. gingivalis</i>	25
Figura 10 - Constituição dos lipopolissacarídeos das bactérias Gram negativas.....	27
Figura 11 - Sinalização por receptores do tipo <i>Toll</i> (TLR).....	29
Figura 12 - Esquema das estruturas químicas adoptadas pelo lípido A de <i>P. gingivalis</i>	30
Figura 13 - Sistema de complemento e sua acção sobre as bactérias.....	33
Figura 14 - Acção do sistema de complemento na capacidade de opsonização e fagocitose bacteriana.....	33
Figura 15 - Disbiose e periodontite induzidas pela <i>P. gingivalis</i>	34
Figura 16 - Percurso intracelular de <i>P. gingivalis</i>	38
Figura 17 - Adesão de neutrófilos a células endoteliais e diapedese.....	44
Figura 18 - Mecanismos inflamatórios que resultam em reabsorção óssea na periodontite.....	48

Figura 19 - Associação entre inflamação periodontal crónica e patogénese das doenças cardiovasculares.....	53
Figura 20 - Modelo da patogénese da periodontite na iniciação da artrite reumatóide.....	56

Índice de tabelas

Tabela 1 - Classificação da microbiota oral predominante.....	10
Tabela 2 - Prevalência de <i>Porphyromonas gingivalis</i> em indivíduos saudáveis e com periodontite.....	21
Tabela 3 - Recetores do tipo toll e os seus ligandos.....	42
Tabela 4 - Células dos tecidos periodontais com TLR e suas funções.....	42

Lista de Abreviaturas

ACPA - Anticorpos anti Proteínas Citrulinadas

CLSM - Confocal laser scanning microscopy

CMV – Citomegalovírus

CPI – Índice periodontal comunitário

DAS28 - Disease Activity Score in 28 Joints

GAPDH - Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

GRADE - Grading of Recommendations Assessment, Development and Evaluation

HSV – Vírus herpes simplex

ICAM – Moléculas de adesão intercelular

ICDA - Clinical Disease Activity Index

IFN- γ – Interferão gama

Ig – Imunoglobulinas

IMC – Índice de massa corporal

LPS – Lipopolissacáridos

MBP – Proteína básica de mielina

MCP – Proteína de recrutamento de monócitos

MIP – Proteína inflamatória de macrofagos

MMP – Metaloproteinases

NK – Natural killer

OCP – Células precursoras de osteoclastos

OMS – Organização mundial da saúde

OPG – Osteoprotegrina

PAD - Peptidil Arginina Desaminases

PAMPS - Pathogen Associated Molecular Patterns

PDT – Terapia fotodinâmica

PMN – Polimorfonucleares

PPR – Receptores de reconhecimento de padrões

RANKL – Receptor activador do factor nuclear κ B

RANTES - Regulated on activation, normal T cell expressed and secreted

ROS – Espécies reactivas ao oxigénio

TGF – Factor de transformação do crescimento

TLR – Receptors *Toll*-like

TNF – Factor de necrose tumoral

Introdução

Grande parte dos ecossistemas microbiológicos que são estudados atualmente apresentam uma grande variedade de microrganismos, sendo a cavidade oral um desses exemplos. Na cavidade oral já foram identificadas mais de 700 espécies de bactérias constituintes do microbioma oral, estando presentes entre 100 a 200 espécies diferentes em casos de saúde oral. Esta grande diversidade de bactérias apresenta flutuações sendo transformada e moldada por diversas características como diferentes ecossistemas (ex. posições dentárias, sulco gengival), por acontecimentos como alterações que ocorram no seu meio ambiente (ex. higiene oral, alimentação), e por interações com os sistemas e tecidos do hospedeiro (Kolenbrander, Palmer et al. 2010).

O microbioma constitui uma variedade de espécies bacterianas que foram identificadas pelo seu genoma sendo que, apesar desta grande diversidade, na cavidade oral existem bactérias que estão presentes numa comunidade estável e em simbiose com o hospedeiro em casos de saúde oral. Quando existem alterações nesta simbiose ocorre um aumento qualitativo e quantitativo na comunidade bacteriológica, designado de disbiose, com potencial patogénico resultando em doenças orais como a cárie, periodontite e abscessos (How, Song et al. 2016).

As bactérias que estão geralmente presentes na cavidade oral são divididas e classificadas em Gram positivas e negativas, e classificam-se também de acordo com as suas necessidades em oxigénio (anaeróbias estritas e anaeróbias facultativas) (Tabela 1) (How, Song et al. 2016).

Tabela 1 – Classificação da microbiota oral predominante [adaptado de (How, Song et al. 2016)]

Grupo Microbiano	Espécies Bacterianas
Gram positivos	
Aérobios e anaérobios facultativos	<i>Streptococcus</i> (<i>S. gordonii</i> , <i>S. mitis</i> , <i>S. auralis</i> , <i>S. salivarius</i>) <i>Staphylococcus</i> (<i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i>) <i>Enterococcus</i> (<i>E. faecalis</i>) <i>Lactobacillus</i> (<i>L. casei</i> , <i>L. fermentum</i>) <i>Corynebacterium</i> (<i>C. matruchotii</i>) <i>Actinomyces</i> (<i>A. naeslundii</i> , <i>A. israeli</i> , <i>A. viscosus</i>) <i>Arachnia</i> (<i>A. propionica</i>) <i>Rothia</i> (<i>R. dentocariosa</i>)
Anaeróbios estritos	<i>Bacillus</i> (<i>B. cereus</i>) <i>Propionibacterium</i> (<i>P. acnes</i>) <i>Peptostreptococcus</i> (<i>P. micros</i> , <i>P. anaerobius</i>)
Gram negativos	
Aérobios e anaérobios facultativos	<i>Campylobacter</i> (<i>C. rectus</i> , <i>C. concisus</i> , <i>C. gracilis</i>) <i>Aggregatibacter</i> (<i>A. actinomycetemcomitans</i>)
Anaeróbios estritos	<i>Fusobacterium</i> (<i>F. nucleatum</i>) <i>Porphyromonas</i> (<i>P. gingivalis</i>) <i>Prevotella</i> (<i>P. melaninogenica</i> , <i>P. oralis</i> , <i>P. intermedia</i>)

Na cavidade oral a associação e interação de bactérias não é aleatória havendo associações específicas entre espécies no intuito do seu estabelecimento, sobrevivência e subsistência. O biofilme formado na superfície dentária é constituído por micro-colónias com sistemas primitivos de comunicação, sendo a sua presença fundamental para o estabelecimento de um equilíbrio com o sistema imune inato. Existem diversas fases de formação de placa começando em película adquirida, placa jovem supragengival, placa madura supragengival e terminando na formação de placa subgengival. Consoante a fase de formação de placa difere também a composição bacteriana, sendo as bactérias divididas em colonizadores primários e colonizadores secundários ou tardios (Figura 1) (Hung 2015).

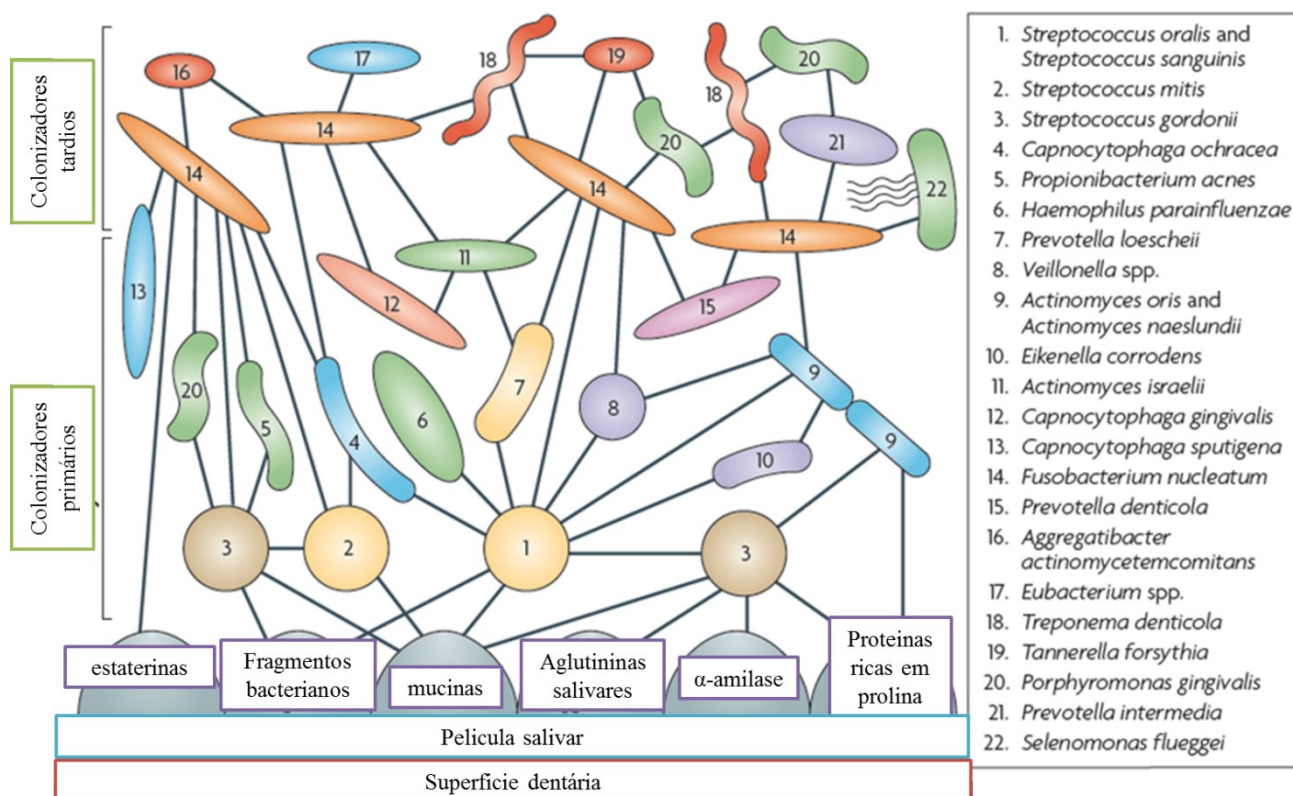


Figura 1 - Modelo espacial e temporal da colonização bacteriana oral [adaptado de (Kolenbrander, Palmer et al. 2010)]

A periodontite é uma doença muito estudada e caracterizada pela progressiva destruição dos tecidos de suporte do dente. Esta é consequência de uma infecção por agentes patogênicos (bactérias periodontopatogênicas), resultando numa resposta inflamatória característica com possíveis repercussões irreversíveis no que diz respeito aos tecidos de suporte do dente bem como do próprio dente (Figura 2) (Hung 2015).

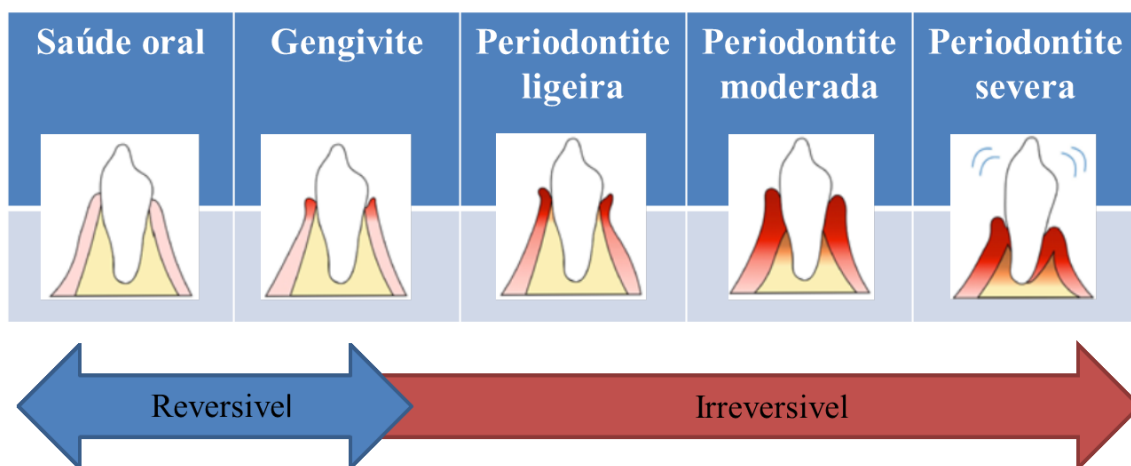


Figura 2 - Etapas de evolução da periodontite [adaptado de (Hung 2015)]

Ao longo dos anos foram associadas e investigadas diversas doenças da cavidade oral tais como a periodontite, à qual foram associadas diversas bactérias que foram agregadas num grupo denominado de complexo vermelho que inclui *Porphyromonas gingivalis*, *B. forsythus* e *T. denticola* (Figura 3). Percebeu-se que para se entender a biologia por detrás da doença era preciso saber mais sobre as bactérias em si. Desde que a *Porphyromonas gingivalis* foi associada à periodontite tem sido bem caracterizada e investigada no que diz respeito à sua composição e estrutura (fatores de virulência e outros), sendo a bactéria mais fácil de manipular geneticamente e de crescer comparando com as outras bactérias pertencentes ao complexo vermelho (Darveau, Hajishengallis et al. 2012).

As interações inter-espécies e intra-espécies na cavidade oral são altamente organizadas e dependem de um conjunto de fatores que se vão alterando ao longo do tempo. Dentro desses fatores destacam-se a fase de maturação da placa, a condição dos tecidos em redor e a própria resposta imunitária do hospedeiro. Tendo em conta todas estas características e comportamentos microbiológicos desenvolvidos pelas diversas espécies bacterianas, estas foram agrupadas em diversos complexos microbianos e divididos em colonizadores primários e colonizadores secundários ou tardios (Figura 3) (Kolenbrander, Palmer et al. 2010; Hung 2015).

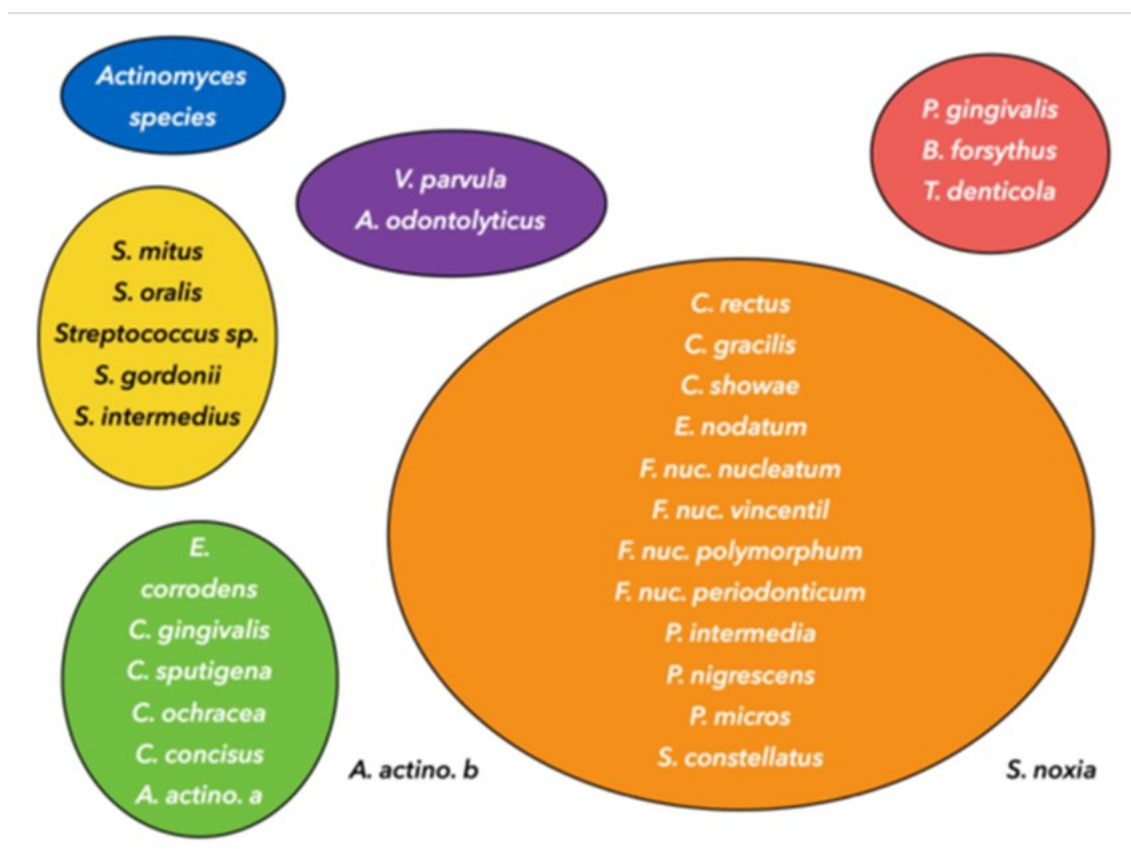


Figura 3 - complexos microbianos – complexo azul, amarelo, verde e roxo constituem os colonizadores primários – complexo laranja e vermelho constituem os colonizadores secundários [adaptado de (Hung 2015)]

Este trabalho tem como objetivos a caracterização da bactéria *Porphyromonas gingivalis* enquanto entidade individual e enquanto microrganismo integrado no microbioma da cavidade oral, interações entre a *P. gingivalis* e os sistemas do hospedeiro e causas e consequências de patologias orais e sistêmicas associadas a esta bactéria.

Para a realização deste trabalho de revisão foram consultadas as bases de dados PubMed e b-on onde foram utilizadas palavras chave como “*Porphyromonas gingivalis*” (6,513 artigos no Pubmed e 24,656 artigos no b-on), “*Porphyromonas gingivalis* lps” (653 artigos no Pubmed e 5,382 artigos no b-on), “*Porphyromonas gingivalis* periodontitis” (3,382 artigos no Pubmed e 12,950 artigos no b-on), “*Porphyromonas gingivalis* virulence” (1,407 artigos no Pubmed e 6,969 artigos no b-on), “*Porphyromonas*

gingivalis invasion” (219 artigos no Pubmed e 4,181 artigos no b-on), “*Porphyromonas gingivalis* biofilm” (558 artigos no Pubmed e 5,980 artigos no b-on) e “*Porphyromonas gingivalis* atherosclerosis” (255 artigos no Pubmed e 2,753 artigos no b-on) entre outras. Foram selecionados para consulta os artigos que eram do tipo de revisão bibliográfica, artigos dos últimos 5 anos, que continham as palavras-chave no seu título e que no resumo referiam aspetos importantes para os objetivos deste trabalho. No total foram selecionados e lidos cerca de 120 artigos sendo incorporados neste trabalho cerca de 71 artigos. Foram realizadas pesquisas também em 2 livros de microbiologia tendo sido incorporados neste trabalho.

Porphyromonas gingivalis

Características Gerais

Porphyromonas gingivalis é uma bactéria cocobacilar Gram negativa anaérobea estrita (Figura 4A). É uma bactéria não móvel, com cápsula, assacarolítica que adquire uma coloração preta/escura característica em placas de gelose de sangue devido à agregação do grupo heme na sua superfície celular (Figura 4B) (Belibasakis 2012; Hung 2015; How, Song et al. 2016).

O seu nome tem origem grega com a junção do adjetivo grego “porphyreos” que significa roxo, com o nome grego “monas” que significa unidade, referindo-se assim a um grupo de bactérias com coloração característica resultante da acumulação de ferro ou derivados (How, Song et al. 2016).

Para o seu crescimento e desenvolvimento é necessária a presença de moléculas como a hemina / grupo heme / ferro e vitamina K (Belibasakis 2012).

As áreas subgengivais, como nos casos de bolsas periodontais, são zonas pobres em açúcares, no entanto existem moléculas mais simples como péptidos e aminoácidos, resultantes de processos de destruição e morte celular das células do hospedeiro e das bactérias, que servem de fonte de energia para a *P. gingivalis* (Belibasakis 2012; How, Song et al. 2016).

É uma bactéria associada ao início e progressão da periodontite crónica e agressiva, sendo encontrada na mucosa jugal, língua, amígdalas, palato, placa supragengival e especialmente na placa subgengival, nomeadamente em bolsas periodontais em quantidades representativas de até 7% do microbioma total (Nelson, Fleischmann et al. 2003; Belibasakis 2012; Tribble, Kerr et al. 2013; Mysak, Podzimek et al. 2014).

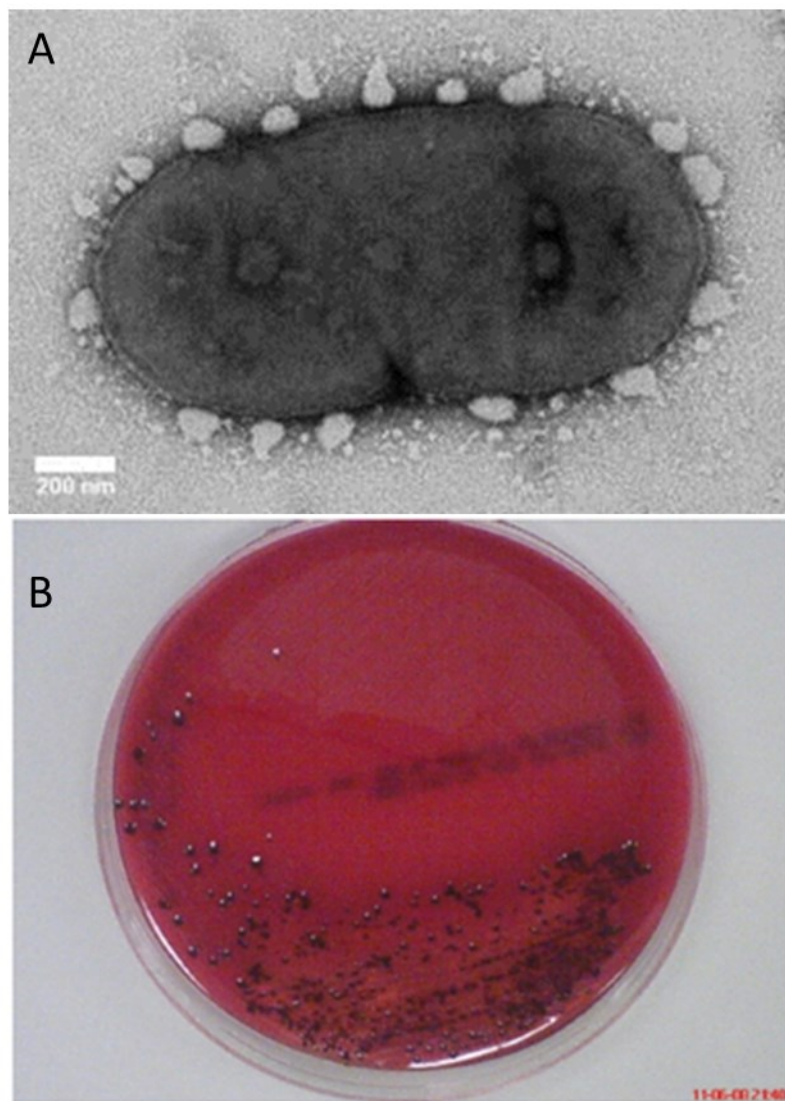


Figura 4 – Características morfológicas e culturais da *P. gingivalis*. **A)** *Porphyromonas gingivalis* visualizada no microscópio eletrônico [adaptado de (Hung 2015)] **B)** Colônias de *P. gingivalis* pigmentadas de preto em meio de sangue de cavalo [adaptado de (How, Song et al. 2016)]

Epidemiologia das infecções por *P. gingivalis*

O microbioma humano oral, numa situação normal de saúde oral, é constituído por inúmeros tipos de microrganismos endógenos, cariogénicos, periodontopatogénicos e oportunistas que, em condições estáveis e em conjugação com um hospedeiro saudável, não resultam em doenças orais. Por outro lado, em hospedeiros com fatores de risco de desenvolvimento de doenças tais como a idade mais avançada, imunidade reduzida, fatores anatómicos desfavoráveis, dieta desfavorável, má higiene oral, hábitos tabágicos, alcoólicos e presença de outras morbilidades como a diabetes, estes microrganismos endógenos podem causar doenças locais tais como a cárie, gengivite, periodontites e, posteriormente, doenças sistémicas e crónicas de que são exemplo as doenças cardiovasculares (Warinner, Rodrigues et al. 2014; Torrungruang, Jitpakdeebordin et al. 2015).

A placa dentária é formada por micróbios, proteínas e nutrientes que, ao longo do tempo em que é depositada, endurece e forma o chamado cálculo dentário ou tártaro. Ao longo dos últimos anos diversos cientistas, tais como Christina Warinner, da Universidade de Oklahoma (EUA), têm-se debruçado sobre a evolução do microbioma humano e de como este foi afetado ao longo dos últimos séculos com as alterações do estilo de vida (Madhusoodanan 2016).

O primeiro estudo descritivo do microbioma oral ancestral foi precisamente realizado por Christina Warinner e os seus colaboradores (2014), que a partir de esqueletos humanos (com evidências de doença periodontal) datados da Idade Média (ano 950-1200) na localidade de Dalheim (Alemanha), retiraram amostras de cálculo dentário e detetaram a presença de ADN e proteínas derivadas de bactérias periodontopatogénicas como *T. forsythia*, *Porphyromonas gingivalis* e *Treponema denticola*. Sobre a bactéria *P. gingivalis*, 802 genes da mesma foram detetados 2,588 vezes, e 7 proteínas e 72 péptidos foram também detetados. Identificaram-se ainda fatores de virulência proteicos, em amostras de cálculo dentário ancestrais e modernos, nomeadamente proteases de arginina e de lisina e a proteína pilina derivados de *P. gingivalis*.

Já foram identificados na saliva e no fluido gengival cerca de 45 proteínas que atuam como agentes antimicrobianos nas primeiras fases de resposta do sistema imune inato. Christina Warinner (2014) identificou 43 proteínas humanas em amostras de cálculo dentário ancestral das quais 25 estão envolvidas na resposta imune inata (Figura 5).

Verificou que 8 proteínas demonstraram propriedades antimicrobianas tais como α -defensina, azuroxidina (péptidos catiónicos), calgranulina A e B, lactoferrina (quelantes de íons metálicos), mieloperoxidase (inibidores da protéase) e proteínas bactericidas como a proteína indutora da permeabilidade bacteriana, lisozima C e proteína de reconhecimento de peptidoglicano 1. Cerca de 1/3 das proteínas humanas identificadas estão presentes em amostras de cálculo dentário moderno e ancestral, sendo os perfis funcionais muito semelhantes (Figura 5). A expressão da maior parte destas proteínas é feita por neutrófilos que são recrutados para os locais de lesão por IgG's e têm uma vida útil inferior a 24h. Assim, estas proteínas provenientes dos neutrófilos só são libertadas durante as fases de infeção ativa e inflamação.

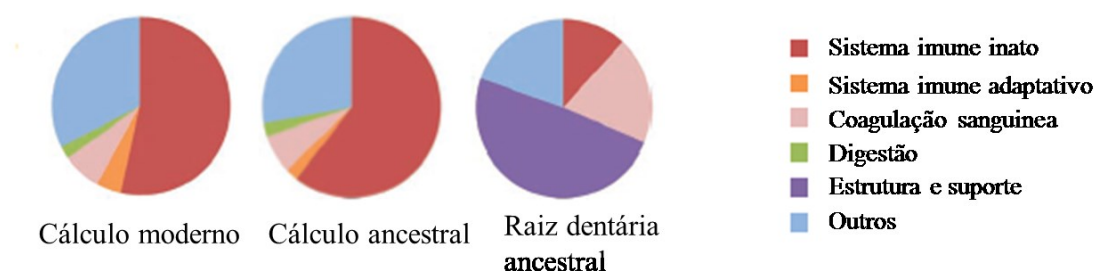


Figura 5 – Comparação proteica em amostras de cálculo dentário ancestral e moderno [adaptado de (Warinner, Rodrigues et al. 2014)]

A abundância de proteínas inflamatórias e anti-inflamatórias presentes em amostras de cálculo dentário ancestral, juntamente com evidências morfológicas de perda de inserção e de reabsorção óssea, são características fortemente associadas à periodontite ativa. Pode assim concluir-se destes estudos que a periodontite é uma doença humana muito antiga e que as bactérias a ela associadas também, o que indica que a composição do microbioma humano é de certa forma independente da higiene oral, dieta e estilo de vida ou que estes não mudaram suficientemente ao longo do tempo para alterarem a composição do microbioma.

Outros autores como Jessica Metcalf defendem que os microrganismos ancestrais representam uma peça fundamental do puzzle, sendo o seu estudo essencial para a nossa maneira de compreender e reconstruir os nossos estilos de vida antigos e mesmo na era pré-antibiótica. Só após a análise desta informação é que se deve avançar para a manipulação do microbioma humano com objetivos terapêuticos (Madhusoodanan 2016).

Prevalência de *Porphyromonas gingivalis* em indivíduos saudáveis e com periodontite

A doença periodontal e a cárie dentária são as doenças da cavidade oral com maiores índices de prevalência nas populações mundiais. Ao longo dos anos, diversos investigadores e organizações, como a OMS (Organização Mundial da Saúde), realizaram estudos de prevalência e severidade da doença periodontal em diversas populações de países desenvolvidos e em desenvolvimento. Apesar de apresentar certas limitações, o índice CPI (Índice Periodontal Comunitário), tem sido o mais utilizado em estudos epidemiológicos periodontais.

Ao longo dos últimos 30 anos diversos países realizaram estudos nacionais de prevalência e severidade da doença periodontal, pelo índice CPI, providenciando-os a uma base de dados da OMS onde são analisados e publicados. A última revisão pela OMS em que se referem os dados epidemiológicos da doença periodontal data de 2005, onde referem que a classificação mais severa (CPI 4 – bolsas periodontais $\geq 6\text{mm}$) da doença periodontal varia mundialmente entre **10% a 15%** da população adulta, no entanto a classificação mais prevalente corresponde a CPI 2 (hemorragia gengival e tártaro) que reflete a má higiene oral adotada pelas populações. Grupos alvo dentro das populações podem refletir uma severidade e prevalência diferentes, como é o caso dos mais idosos onde a prevalência e a severidade da doença periodontal tende a ser maior comparando com grupos mais jovens; o estatuto socioeconómico também influencia estes parâmetros, em que os baixos rendimentos e os baixos níveis de escolaridade contribuem para maior severidade e prevalência da doença periodontal; a distribuição dentro dos países também varia consoante raças e grupos étnicos, bem como outros fatores que agravam estes parâmetros, entre eles a má higiene oral, consumo de tabaco, consumo excessivo de álcool, má nutrição, stress, diabetes mellitus e outras doenças sistémicas associadas (Petersen and Ogawa 2005).

Como a *P. gingivalis* está associada à doença periodontal ao longo dos últimos anos foram também realizados muitos estudos epidemiológicos onde associaram a prevalência de *P. gingivalis* em indivíduos com periodontite e em indivíduos saudáveis.

Yang et al., 2004, em Taiwan, estudou a presença das bactérias *P. gingivalis* e *T. forsythensis* em pacientes com periodontite e com saúde oral. Obtiveram resultados positivos para a presença de *P. gingivalis* em 85,7% dos 407 indivíduos com a doença e

em 23,1% dos 91 indivíduos saudáveis (Tabela 2) [referido por (Belibasakis 2012; How, Song et al. 2016)].

Num estudo epidemiológico realizado na Tailândia com o objetivo de analisar a associação entre 5 espécies bacterianas e a periodontite severa na população desse país, num grupo de 479 indivíduos diagnosticados sem periodontite ou com periodontite ligeira, em 62,4% (299 indivíduos) foi detetada a presença de *P. gingivalis*. Num grupo de 883 indivíduos com periodontite severa foi detetada a presença da bactéria em 96,1% dos casos (849 indivíduos) associando assim a presença de *P. gingivalis* à periodontite (Tabela 2) (Torrunguang, Jitpakdeebordin et al. 2015).

Num estudo realizado por Maria Rosaria Gatto et al (2014) em Itália, cujo objetivo era investigar a prevalência de seis bactérias periodontopatogénicas em 352 pacientes italianos diagnosticados com periodontite crónica, bem como a sua correlação com outras variáveis (idade, género, hábitos tabágicos, profundidade de sondagem e hemorragia à sondagem) foi detetada a presença de *P. gingivalis* em 78% das amostras (275 indivíduos). *P. gingivalis* foi a única bactéria com correlação significativa com todas as variáveis estudadas exceto com os hábitos tabágicos (Tabela 2) (Maria Rosaria Gatto, Marco Montevicchi et al. 2014).

Num estudo realizado no Japão (2013) cujo objetivo era investigar a prevalência de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* e *Tannerella forsythia* em indivíduos com periodontite crónica e agressiva, verificou-se que nos 10 indivíduos saudáveis não foram encontradas evidências da presença de *P. gingivalis* ou qualquer outra bactéria, verificaram uma prevalência de 75% de *P. gingivalis* em indivíduos com periodontite crónica numa amostra total de 20 indivíduos e uma prevalência de 60% de *P. gingivalis* em indivíduos com periodontite agressiva numa amostra total de 20 indivíduos (Tabela 2) (Tomita, Komiya-Ito et al. 2013).

Em Portugal não se realizou nenhum estudo que analisasse a prevalência de *P. gingivalis* em indivíduos com periodontite.

Ao longo dos anos foram realizados inúmeros estudos de prevalência da *P. gingivalis* com níveis de significância estatística diferentes mas que reportam sempre resultados semelhantes - presença constante desta bactéria em casos de periodontite concluindo-se

assim que na maioria das vezes, esta bactéria, juntamente com outras, está associada e correlacionada com a periodontite.

Tabela 2 – Prevalência de *Porphyromonas gingivalis* em indivíduos saudáveis e com periodontite.

Estudos	Número total de indivíduos Saudáveis	Número total de indivíduos com periodontite	Prevalência de <i>P. gingivalis</i> em indivíduos saudáveis N (%)	Prevalência de <i>P. gingivalis</i> em indivíduos com periodontite N (%)
Kitti Torrungruang et al (2015) – Tailândia	479	883	299 (62,4)	849 (96,1)
Yang et al (2004) – Taiwan	91	407	21 (23,1)	348 (85,7)
Maria Rosaria Gatto et al (2014) - Itália	-	352	-	275 (78)
Nibali, Luigi et al (2012)	-	183 (periodontite crônica) 84 (periodontite agressiva)	-	122 (67) periodontite crônica 43 (54) periodontite agressiva
Sachiyo Tomita et al (2013) - Japão	10	20 (periodontite crônica) 20 (periodontite agressiva)	0 (0)	15 (75) periodontite crônica 12 (60) periodontite agressiva

Colonização da cavidade oral e adesão bacteriana

Quando há criação de condições ambientais favoráveis ao desenvolvimento de *P. gingivalis*, nomeadamente a formação de bolsas periodontais, a *P. gingivalis* coloniza a cavidade oral e vai manipular os sistemas de proteção do hospedeiro no intuito da sua evasão, resultando numa amplificação da sua atividade local (Figura 6). Toda a sua atividade no sentido de invasão celular e ativação de fatores de virulência vai levar a uma alteração na microbiota local a níveis qualitativos e quantitativos, levando a desequilíbrios nas relações anteriormente homeostáticas. As fases finais de proliferação desta bactéria estão associadas a inflamação crônica em que o sistema imune do hospedeiro tenta combater a infecção com prejuízos para as próprias estruturas e com a

sua resistência e disseminação via células inflamatórias (células PMN) para locais distantes com consequências patológicas distantes como por exemplo a formação de placas ateroscleróticas nos vasos sanguíneos (Hussain, Stover et al. 2015).

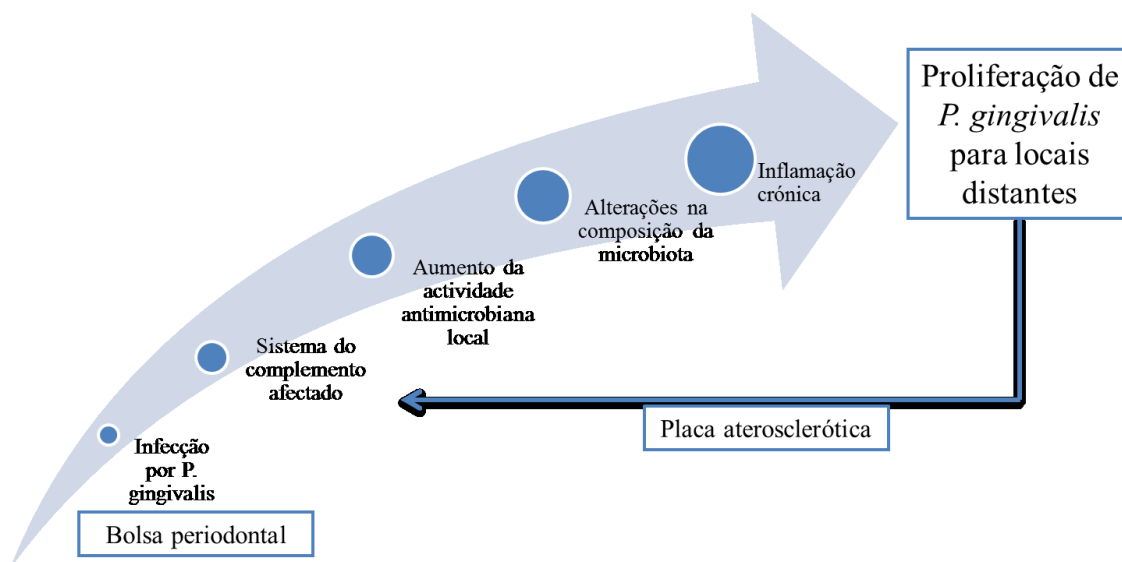


Figura 6 – Modo de ação da *P. gingivalis* [adaptado de (Hussain, Stover et al. 2015)]

No biofilme subgingival a *P. gingivalis* é classificada como bactéria colonizadora tardia ou secundária estando inserida no chamado complexo vermelho juntamente com *B. forsythus* e *T. denticola*, espécies estas associadas a lesões periodontais (Figura 3) (Mysak, Podzimek et al. 2014; Hung 2015; How, Song et al. 2016).

Como colonizadora secundária a sua adesão ao biofilme pré-existente depende das outras bactérias colonizadoras primárias como por exemplo de *Streptococcus spp.* que representam cerca de 60 a 90% dos colonizadores iniciais do esmalte (Richard J. Lamont 2002; Periasamy and Kolenbrander 2009).

A adesão neste caso é específica para as proteínas antigénicas I/II (Ssp) expressas por *S. gordonii*. Verificou-se que as células de *P. gingivalis* aderem rapidamente a um biofilme de *S. gordonii*, mas não de *S. mutans*, aumentando o seu número progressivamente ao longo do tempo (Figura 7) (Richard J. Lamont 2002).

Mais recentemente observou-se a associação mutualista (relação favorável de associação entre espécies) entre a *P. gingivalis* com colonizadores iniciais (*S. gordonii* e *A. oris*), primários (*Veillonella* sp.), intermédios (*F. nucleatum*) e tardios (*A. actinomycetemcomitans*) permitindo que estas bactérias formem comunidades complexas multi espécies tendo a *P. gingivalis* um papel ativo importante nas mesmas. Quando colocadas 2 espécies em cultura, foi verificada a interação mutualística sem crescimento entre as espécies *P. gingivalis* e *Streptococcus oralis*. Por outro lado foi verificada a interação com crescimento mútuo entre as espécies *P. gingivalis* – *S. gordonii*; *P. gingivalis* – *Veillonella* sp.; *P. gingivalis* - *F. nucleatum*; *P. gingivalis* - *A. actinomycetemcomitans* e houve um crescimento comensal entre *P. gingivalis* e *A. oris* (Figura 8) (Periasamy and Kolenbrander 2009).

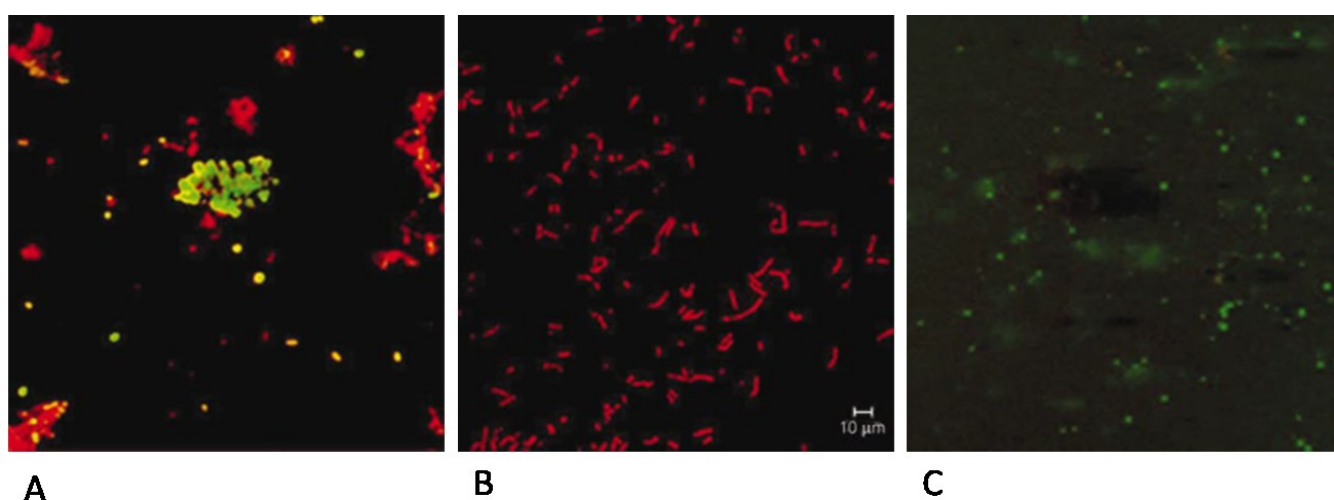


Figura 7 – Visualização por microscopia CLSM (“Confocal laser scanning microscopy”) do desenvolvimento do biofilme de *P. gingivalis* em caldo de soja tripticaseína. **A)** Presença de bactérias *P. gingivalis* (verde) aderidas e formando microcolônias com *S. gordinii* (vermelho) por microscopia CLSM. **B)** Não formação de biofilme entre *P. gingivalis* (verde) e *S. mutans* (vermelho) por microscopia CLSM. **C)** Não formação de colônias de *P. gingivalis* (verde) na ausência de substrato de *Streptococcus spp.* (Richard J. Lamont 2002)

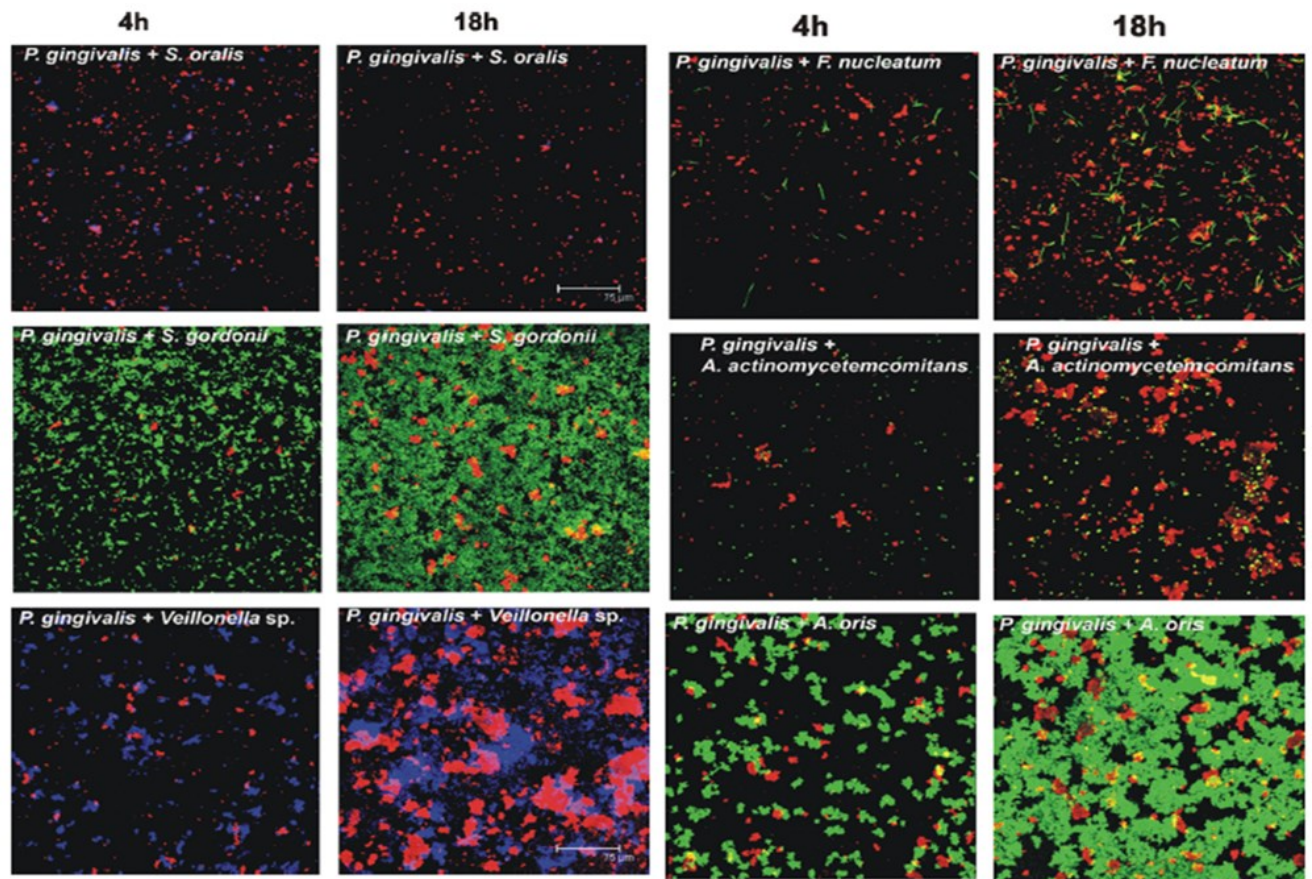


Figura 8 - Interações mutualísticas entre *P. gingivalis* e diversas bactérias presentes na cavidade oral por microscopia CLSM (Periasamy and Kolenbrander 2009)

Fatores de virulência

Os mecanismos de defesa do hospedeiro são manipulados pela bactéria *P. gingivalis* que na sua constituição incorpora um variado número de fatores de virulência que conferem características patogénicas ao organismo, alterando mecanismos inatos de proteção periodontal que estão ativos e funcionais em casos de saúde oral.

Os fatores de virulência presentes na bactéria *P. gingivalis* são os ***pilis* comuns** (ou fímbrias), **proteases**, **LPS** e a própria **cápsula** que envolve a bactéria (Figura 9).

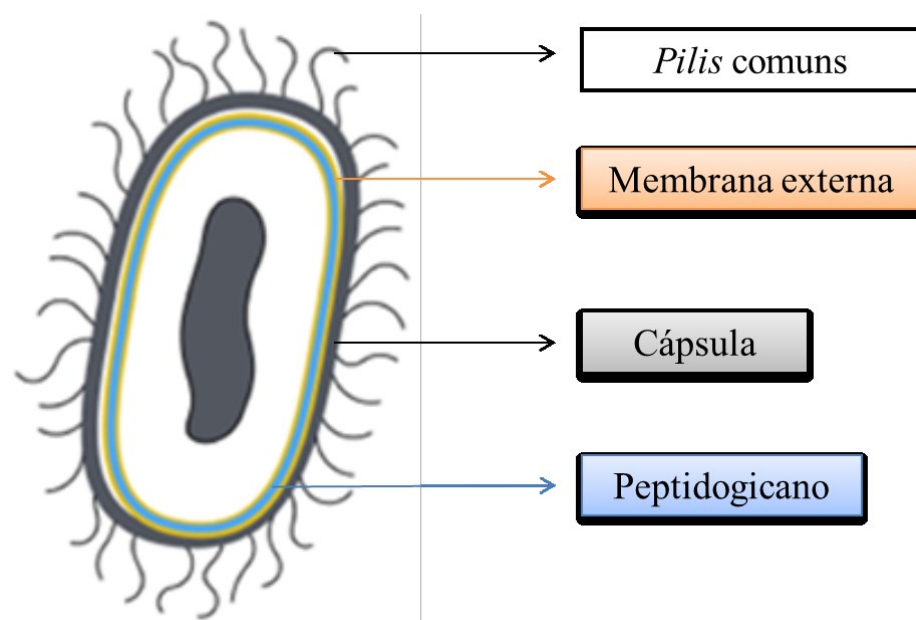


Figura 9 - Constituição da bactéria *P. gingivalis* [adaptado de (Hung 2015)]

Cápsula

A **cápsula** constitui a camada mais externa da bactéria funcionando como barreira e meio de proteção da mesma a possíveis “agressões” provenientes do meio envolvente da mesma (ex. moléculas do sistema imunitário do hospedeiro – resistência a fagocitose por eosinófilos, basófilos e neutrófilos, genericamente designados por células polimorfonucleares pois possuem um núcleo bilobulado, trilobulado ou pentalobulado) (Figura 14). Sendo esta a camada mais externa da bactéria é nesta que residem capacidades diferenciais de adesão a células epiteliais (Belibasakis 2012).

A cápsula é também denominada como antígeno K porque possui a capacidade de desencadear respostas imunitárias mediadas por anticorpos IgG's. Existem seis serotipos diferentes de cápsulas (K1 a K6) de *P. gingivalis* que refletem diferentes capacidades de estimulação citocínica por parte de células dendríticas e de estimulação química por parte de macrófagos através da **MCP-1** (proteína de recrutamento de monócitos), **MIP-1** (proteína inflamatória de macrófagos) e da proteína **RANTES** responsável pela ativação e regulação de linfócitos T (Belibasakis 2012; Vernal, Diaz-Guerra et al. 2014) (d'Empaire, Baer et al. 2006).

Laine & van Winkelhoff em 1998 através de estudos em ratos descobriram que estirpes de *P. gingivalis* que continham na sua constituição cápsulas eram muito mais invasivos e promoviam a disseminação da infecção, comparado com as estirpes que não continham cápsulas que apenas provocavam pequenos abscessos [Revisto por (Belibasakis 2012; Vernal, Diaz-Guerra et al. 2014)].

O único estudo realizado sobre a prevalência dos 6 serotipos capsulares de *P. gingivalis* data do ano de 1997, onde foram retiradas 185 amostras da bactéria *P. gingivalis* de 185 indivíduos com periodontite sendo que apenas 84 (45,4%) das amostras eram classificáveis quanto ao serotipo capsular. Os serotipos dominantes obtidos neste estudo foram **K5** (12%) e **K6** (23,2%) sendo que os outros serotipos representavam entre 1,1% e 3,7% da amostra total de 185 indivíduos com periodontite. Todas as 185 amostras de *P. gingivalis* apresentavam coloração como método de detecção de cápsula mas nem todas eram classificáveis de K1 a K6 e por esta razão estes autores defendem que existem outros serotipos capsulares que ainda não foram classificados (Laine, Appelmelk et al. 1997).

Num estudo realizado por Rolando Vernal et al (2014) cujo objetivo era determinar se a regulação de padrões de secreção e expressão de citocinas era influenciado pela exposição de diferentes serotipos K a células dendríticas, verificou-se uma grande variabilidade na resposta de linfócitos T (diferentes serotipos originam diferentes respostas) (Vernal, Diaz-Guerra et al. 2014). A secreção de citocinas **IL-1** e **IL-17**, que têm funções na regulação de respostas imunológicas e inflamatórias, na expressão de integrinas em leucócitos e células endoteliais e no recrutamento de neutrófilos e monócitos, aumenta com a diferenciação e ação nos tecidos periodontais de linfócitos Th1 e Th17, associados aos serotipos K1 e K2, contribuindo assim para a tese de que estes desempenham um papel importante no início, progressão e mesmo na severidade da doença.

Outras características que a cápsula confere à bactéria incluem a resistência mecânica e química à saliva/soro e seus constituintes e diminuição da indução da quimioluminescência por parte de neutrófilos. Os neutrófilos têm a capacidade de gerar radicais livres de oxigênio que são potentes moléculas antimicrobianas. Após a sua produção e deterioração natural emitem luz conferindo a capacidade de monitorização da ativação de neutrófilos (How, Song et al. 2016).

LPS

Os lipopolissacáridos (**LPS**) da membrana externa de *P. gingivalis* constituem uma barreira permeável eficiente contra produtos tóxicos (ex. agentes antimicrobianos e detergentes), são importantes na manutenção da integridade estrutural da bactéria e podem desencadear cadeias de eventos de sinalização intercelular (Figura 10). Neste caso, as bactérias presentes na cavidade oral, vão ser reconhecidas como sendo patogênicas ou não através de interações, afinidades e trocas de informação com células do sistema imune do hospedeiro como células dendríticas, neutrófilos e células natural killer que possuem recetores de reconhecimento de padrões (**PPR**) como os recetores do tipo *Toll* (**TLR**, *Toll-like receptors*) e o **CD14** solúvel que vão ser ativados na presença desta estrutura da *P. gingivalis* (Belibasakis 2012).

Os LPS das bactérias gram negativas são constituídos por **lípidio A** (endotoxina pirogênica hidrofóbica responsável pela promoção da secreção de citocinas pró-inflamatórias – elemento determinante da patogenicidade bacteriana), polissacárido central e antígeno O (determina respostas contra bactérias por parte de anticorpos) (Barroso, H. et al. 2014).

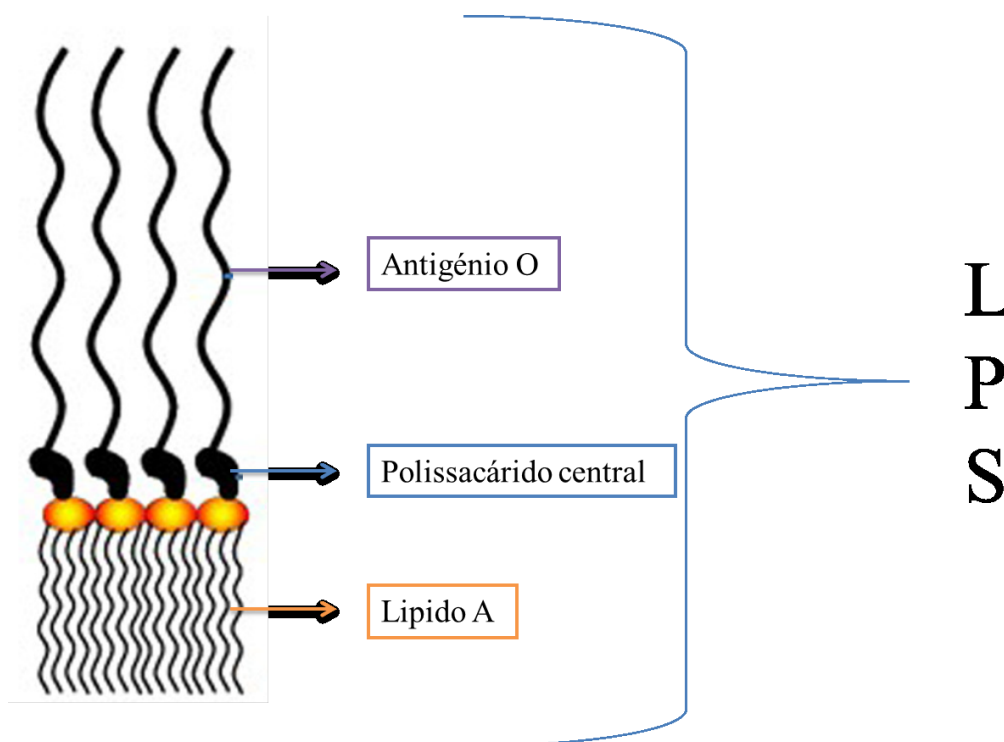


Figura 10 – Constituição dos lipopolissacarídeos das bactérias Gram negativas [adaptado de (How, Song et al. 2016)]

A *P. gingivalis* através do LPS é responsável pela modulação de vias de sinalização por TLR (por estimulação de citocinas pró-inflamatórias como **IL-1**, **IL-8**, **TNF- α** e pela modulação óssea por **RANKL** - Recetor Ativador do Fator Nuclear κ B), **selectina-E** (com funções na adesão a células endoteliais e na diapedese - passagem de leucócitos do sangue, através das paredes dos capilares sanguíneos, para o tecido conjuntivo com o objetivo de combater uma infecção. [Adaptado de <http://medical.dictionary.thefreedictionary.com/diapedesis>]), **TGF- β** (por inibição da sinalização dos recetores de TGF- β em osteoblastos com diminuição da remodelação óssea) (Figura 18) (Du, Zhao et al. 2016).

Estudos *in vitro* que demonstraram que o LPS estimulava citocinas pró-inflamatórias como **IL-1 α** , **IL-1 β** (ambos produzidos por macrófagos, atuando na fase aguda da infecção), **IL-6** (produzido por linfócitos T, atuando na diferenciação de linfócitos B e na fase aguda da infecção), **IL-8** (produzido por linfócitos T, atuando na quimiotaxia e na ativação de PMN) e **TNF α** (produzidos em monócitos e linfócitos T, atuando ao nível da citotoxicidade e febre) (Zhou, Desta et al. 2005; N. Bostanci, R. Allaker et al. 2007; Hamed, Belibasakis et al. 2009)(Goering et al. 2013).

Os recetores **TLR4** desempenham um papel importante no reconhecimento de LPS das bactérias Gram negativas e na ativação celular através da libertação de citocinas. Na membrana citoplasmática das células os recetores **TLR4** ligam-se à proteína adaptadora **MD-2** e, juntamente com **CD14**, formam uma estrutura que atua como recetora de LPS. Quando o LPS se liga a esta estrutura vai ativar diversas vias de sinalização intracelular resultando na ativação do complexo proteico **NF- κ B** que desempenha funções de factor de transcrição no núcleo da célula ativando genes que codificam para diversas citocinas pró-inflamatórias (TNF α ; IL-1; IL-6; IL-8) (Figura 11) (Ogawa 2007).

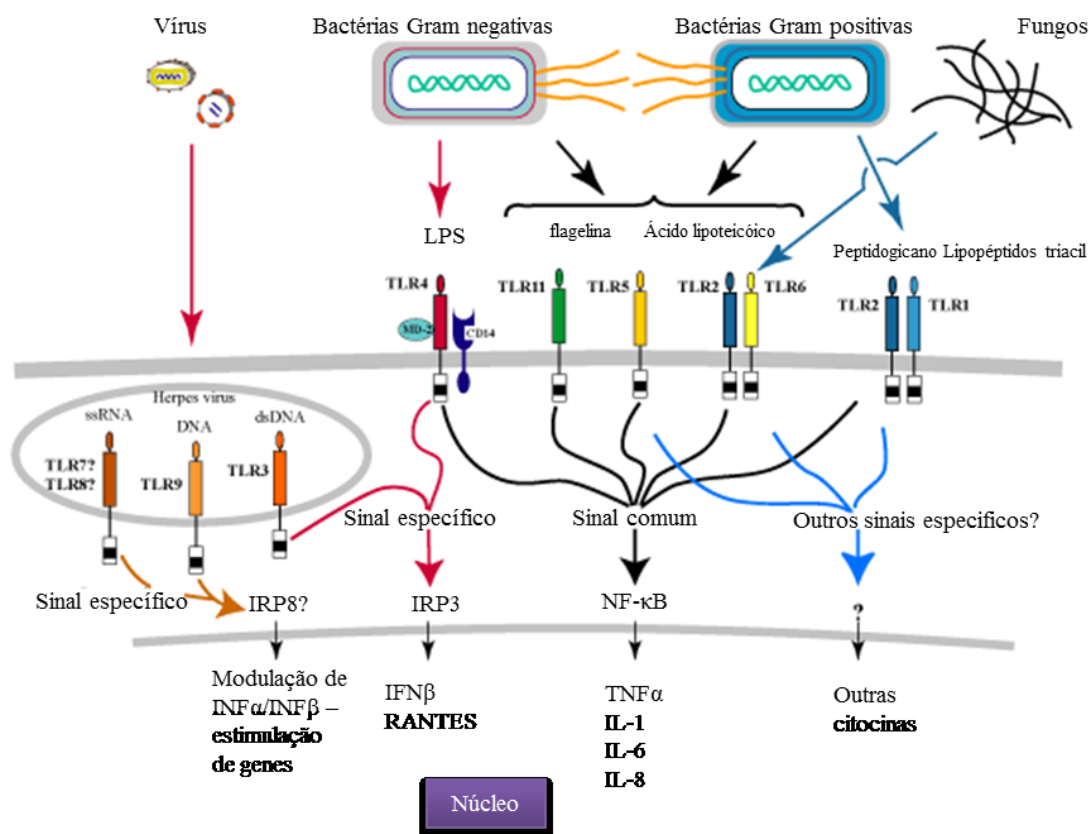


Figura 11 – Sinalização por receptores do tipo *Toll* (TLR) [adaptado de <http://www.inflammation.dk/iir/09inn/tlrsg.htm>]

A *P. gingivalis*, possui diferentes formas estruturais do lípido A que lhe permitem funcionar como agonista ou antagonista do TLR4 (Figura 12).

O lípido A de *P. gingivalis* é sensível a variações ambientais de hemina e quando esta não está presente e disponível são ativadas proteínas fosfatase endógenas (**fosfatase 1 e 4**) que originam um lípido A tetra-acetilado não fosforilado que não se liga ao complexo TLR4 e um lípido A penta-acetilado e mono-fosforilado que funciona como agonista fraco do complexo TLR4. Na presença de hemina a atividade da fosfatase 1 é suprimida resultando na expressão de lípido A tetra-acetilado e mono-fosforilado antagonista de TLR4. Outros moduladores da estrutura do lípido A são a temperatura e o pH (Figura 12) (Slocum, Coats et al. 2014).

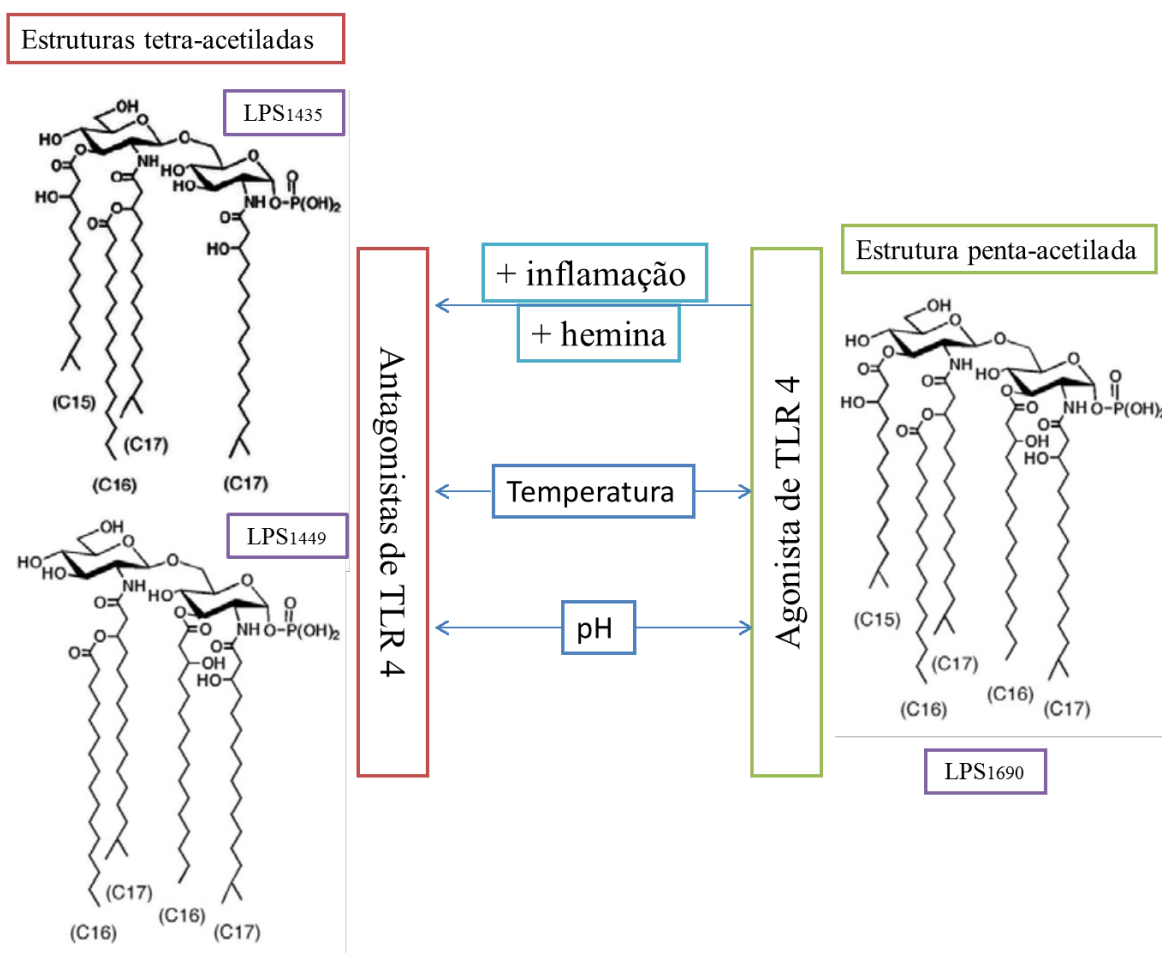


Figura 12 – Esquema das estruturas químicas adotadas pelo lipídeo A de *P. gingivalis* [adaptado de (Ogawa 2007)]

A estrutura penta-acetilada facilita a expressão de **selectina-E** (molécula de adesão presente em células endoteliais e com funções na diapedese) enquanto a estrutura tetra-acetilada funciona como potente antagonista da expressão de **selectina-E** e inibe a progressão da inflamação através da diminuição do infiltrado inflamatório (Reife, Coats et al. 2006).

Coletivamente as modificações e heterogeneidade do LPS da *P. gingivalis* e o seu impacto na regulação imunológica do hospedeiro são exemplos importantes dos mecanismos de adaptação e sobrevivência desta bactéria no hospedeiro (Belibasakis 2012).

A **resistina** é uma proteína implicada na resistência à insulina adquirida, podendo esta exacerbar a progressão da diabetes tipo 2 (Hiroshima, Bando et al. 2012). Pacientes com

artrite reumatoide e com doenças cardiovasculares apresentam valores circulantes desta molécula elevados. A resistina é expressa por adipócitos, células mononucleares, pelo baço e pela medula óssea. Recentemente foi demonstrado que o LPS de *P. gingivalis* (e de *E. coli*) pode estimular a liberação de resistina por neutrófilos. (Furugen, Hayashida et al. 2013). Esta relação entre a *P. gingivalis* e a resistina existe desde há muitos anos uma vez que a resistina foi detetada em amostras de cálculo dentário ancestrais (ano 950-1200) (Warinner, Rodrigues et al. 2014) e poderá sugerir uma associação entre esta bactéria e a diabetes.

Proteases

P. gingivalis tem a capacidade de produzir **proteases de lisina** (Kgp) e de **arginina** (RgpA; RgpB) que representam 10% do total das proteínas produzidas e constituem cerca de 85% do total da atividade proteolítica da bactéria (E. Andrian, D. Grenier et al. 2006; Belibasakis 2012; Warinner, Rodrigues et al. 2014; Hussain, Stover et al. 2015).

As proteases constituintes da *P. gingivalis* têm funções ao nível da adesão e colonização, com capacidade de ligação a diversas proteínas da matriz extracelular como ao fibrinogénio, à fibronectina (ligações integrina-fibronectina), à laminina e ao colagénio tipo V (Tikoo, Gugnani et al. 2015). As proteases de lisina são mediadoras na adesão a células epiteliais e a fibroblastos gengivais. Têm funções na conversão e degradação das diversas formas de hemoglobina (oxihemoglobina e meta-hemoglobina) facilitando a liberação de heme. Funcionam como endopeptidases responsáveis pela degradação de células do soro e dos tecidos do hospedeiro com liberação de péptidos que são utilizados no metabolismo energético da bactéria. São responsáveis pela inativação de péptidos antimicrobianos catiónicos podendo levar à exacerbação da produção sustentável de citocinas pró-inflamatórias (Tikoo, Gugnani et al. 2015).

As proteases conferem capacidade de resistência da *P. gingivalis* à atividade do sistema de complemento devido à sua capacidade proteolítica dos componentes do sistema de complemento **C1**, **C3**, **C4** e **C5**. Impedem a ligação do complexo de ataque à membrana através da captura da proteína de ligação **C4b** essencial para a formação deste complexo contra a *P. gingivalis* (Hussain, Stover et al. 2015; Tikoo, Gugnani et al. 2015).

As proteases têm funções importantes na destruição de proteínas da matriz extracelular (ex. ligações integrina-fibronectina), na proteólise de citocinas, imunoglobulinas, fatores

do sistema de complemento, na estimulação da expressão de metaloproteinases e na clivagem de recetores de linfócitos T (**CD2**; **CD4**; **CD8**) dificultando assim a resposta imunológica e favorecendo a proliferação de *P. gingivalis* (Belibasakis 2012; Tikoo, Gugnani et al. 2015).

Funções antagonistas também se verificam com a inativação proteolítica de **IL-4**; **IL-5** (citocinas anti-inflamatórias) e **IL-12**; **IFN- γ** (citocinas pró-inflamatórias) (Belibasakis 2012).

São produzidos 2 tipos de proteases de arginina (Arg-X) sendo que o tipo **RgpA** apresenta um domínio proteolítico e um domínio de adesão enquanto o tipo **RgpB** apresenta apenas um domínio proteolítico. A protéase de lisina (Lis-X) apresenta apenas o tipo **Kgp** que possui ambos os domínios. As proteases de arginina têm como função principal o recrutamento de neutrófilos em consequência da acumulação de anafilatoxina **C5a** proveniente da cisão da molécula C5 do sistema de complemento (Figura 13). Por outro lado a protease de lisina pode inativar o recetor de **C5a** nos neutrófilos podendo assim prejudicar o seu recrutamento para locais de infecção (Belibasakis 2012).

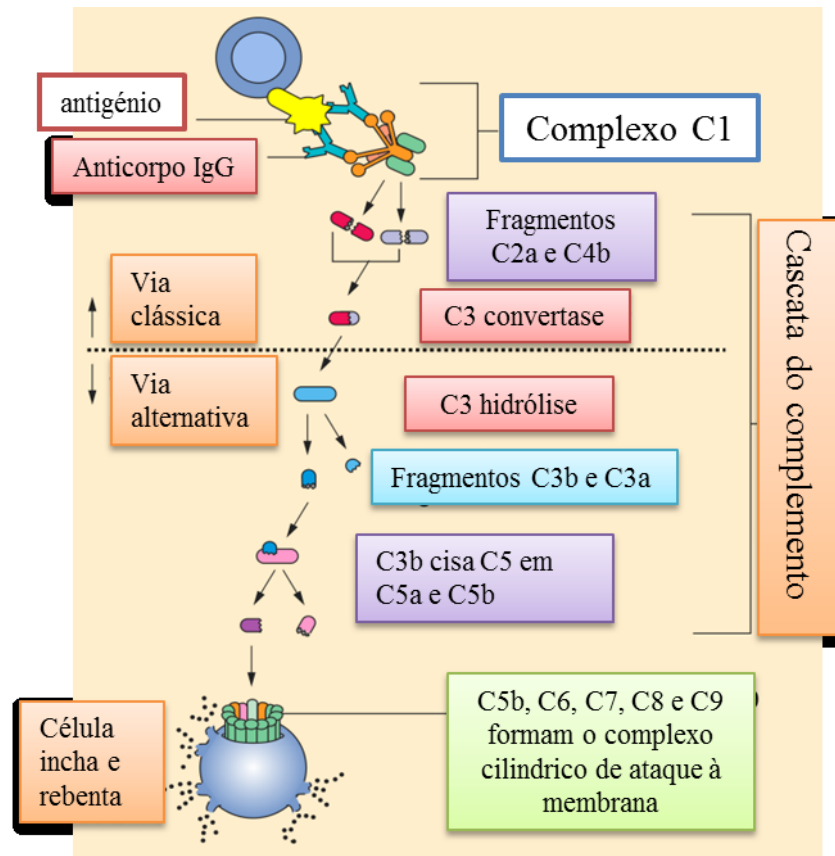


Figura 13 – Sistema de complemento e sua ação sobre as bactérias [adaptado de https://pt.wikipedia.org/wiki/Sistema_complemento]



Figura 14 – Ação do sistema de complemento na capacidade de opsonização e fagocitose bacteriana [adaptado de <http://www.slideshare.net/guest08e813/complement06>]

Em resumo, as alterações potenciadas por proteases de *P. gingivalis* são: 1) **subversão da secreção de IL-8** (quimiocina essencial na migração de neutrófilos para os tecidos inflamados por diapedese); 2) **subversão da atividade do sistema de complemento** por proteólise de componentes do complemento; e 3) **ativação de TLR4** (Figura 15) (Darveau, Hajishengallis et al. 2012). Como consequência dá-se a disbiose da microbiota oral. Como reação, o sistema imunológico aumenta a sua atividade levando a um estado inflamatório. A inflamação exacerbada, com o objetivo de acabar com a disbiose, resulta num conjunto de ações e consequências (destruição de bactérias, tecido gengival, exsudado inflamatório, hemorragia) que tornam o meio rico em nutrientes e outras moléculas (como a hemina) o que vai ditar a proliferação de bactérias proteolíticas e assacarolíticas tais como a *P. gingivalis* pendendo assim o desequilíbrio para as mesmas. Outra consequência da inflamação consiste na reabsorção óssea característica na periodontite que leva a alterações anatômicas favoráveis à proliferação bacteriana e desfavoráveis à higiene oral que não existiria antes do início deste ciclo (Figura 15).

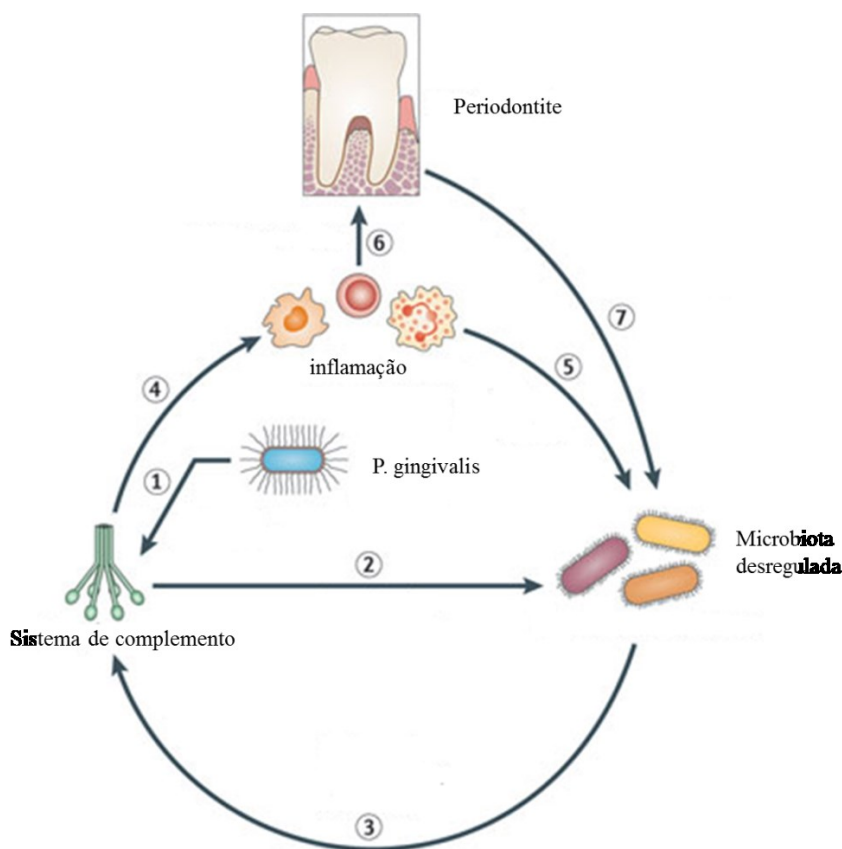


Figura 15 – Disbiose e periodontite induzidas pela *P. gingivalis* [adaptado de(Hajishengallis, Darveau et al. 2012)]

***Pilis* comuns**

***Pilis* comuns ou fímbrias** são protrusões celulares filamentosas constituídas pela proteína pilina, que se encontram na superfície das bactérias Gram negativas e que são cruciais para a adesão bacteriana a outras bactérias (participação nas fases iniciais de formação de biofilmes), a células eucariotas (células epiteliais), e a proteínas salivares e ainda para a estimulação de citocinas via **TLR2** e **TLR4** (Figura 11) (Belibasakis 2012).

Dentro destas temos quatro tipos:

Tipo I (major - 41-45 KDa) com apêndices longos (0,3-3 micras) constituídos por subunidades de pilina codificadas pelo gene dominante *FimA* que existe no cromossoma da *P. gingivalis*. Tem um papel importantes na colonização e invasão; (E. Andrian, Grenier et al. 2006; Belibasakis 2012; Mysak, Podzimek et al. 2014) ***FimA*** é um gene que codifica as subunidades de pilina, sendo que até agora seis genótipos de *fimA* foram descobertos (I, Ib, II, III, IV, V) sendo o tipo I mais prevalente em *P. gingivalis* presentes em indivíduos saudáveis e o tipo II mais prevalente em *P. gingivalis* presentes em indivíduos com periodontite (Amano, Nakagawa et al. 2004; E. Andrian, Grenier et al. 2006; Tribble, Kerr et al. 2013; Mysak, Podzimek et al. 2014).

Tipo II (minor - 67 KDa) constituído por subunidades proteicas *Fimbria* minor (Mfa1) codificadas pelo gene *Mfa1*. Possui maior capacidade pró-inflamatória (E. Andrian, D. Grenier et al. 2006; Belibasakis 2012; Mysak, Podzimek et al. 2014).

Tipo III – *pilis* de secreção em bactérias anaeróbias (Barroso, H. et al. 2014).

Tipo IV – *pilis* responsáveis pela mobilidade bacteriana (sem flagelos) estando também envolvidos na adesão bacteriana e na troca e entrada de informação sob a forma de ADN nas bactérias anaeróbias (Barroso, H. et al. 2014).

Pilis comuns tipo I e tipo II induzem a produção de citocinas pró-inflamatórias como **IL-1, IL-6, IL-8, TNF- α** bem como de metaloproteinases – **MMP-9** por parte de várias células do hospedeiro (macrófagos e monócitos) (Belibasakis 2012; Mysak, Podzimek et al. 2014).

Permitem a adesão a diferentes proteínas de células eucarióticas nomeadamente a fibronectina, colagénio, laminina, proteínas ricas em prolinas derivadas da saliva,

glicoproteínas ricas em prolina e estaterinas assim como a proteínas procarióticas como GAPDH (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase) presente em *Streptococcus oralis* (Mysak, Podzimek et al. 2014).

Vários estudos experimentais em ratos demonstraram que a imunização contra os *pilis* comuns, protege contra a destruição tecidual periodontal - ratos infectados com *P. gingivalis* sem *pilis* comuns apresentavam perda de osso menor do que ratos infectados com *P. gingivalis* com *pilis* comuns (Moreno Sandraa 2013). Apesar deste resultado, devido à diversidade genotípica observada na estrutura desta bactéria bem como a heterogeneidade de antígenos existentes, todos os esforços direcionados para combate a esta bactéria através dos *pilis* comuns foram até agora infrutíferos (Belibasakis 2012; Mysak, Podzimek et al. 2014).

Interação com células epiteliais da mucosa oral

A barreira epitelial na cavidade oral é a primeira barreira física prevenindo a invasão de diversos microrganismos. No entanto diversas bactérias (ex. *P. gingivalis*, *Tannerella forsythia* e *T. denticola*) desenvolveram estratégias de adaptação e sobrevivência que permitem a invasão das células epiteliais (Sakanaka, Takeuchi et al. 2016).

O processo de infecção intracelular é dividido em 4 fases – **adesão; invasão; processamento intracelular; saída.**

Adesão e Invasão

Esta propriedade advém da afinidade da fimbria major - *FimA* – tipo II (presente na superfície da bactéria) por recetores $\alpha 5 \beta 1$ (integrinas) presentes na superfície das células epiteliais do hospedeiro. A atividade proteolítica das proteases de arginina e lisina também estão intimamente ligadas com papéis fisiológicos no que diz respeito à adesão direta destas bactérias a células epiteliais por exposição de recetores crípticos que são ativados por ação proteolítica (E. Andrian, D. Grenier et al. 2006; Belibasakis 2012; Ho, Chen et al. 2015; Sakanaka, Takeuchi et al. 2016).

Após a ligação das *pilis* comuns ao recetor celular são transmitidos um conjunto de sinais pela célula, que vão resultar num rearranjo do citoesqueleto de actina tanto ao nível microfilamentar como ao nível da atividade dos microtúbulos, formando-se

invaginações da membrana citoplasmática que facilitam a encapsulação da bactéria num endossoma primário (Figura 16). Esta característica da *P. gingivalis* é partilhada por outras bactérias como por ex. *Neisseria gonorrhoeae*, *Haemophilus influenzae*, e *Citrobacter freundii* (E. Andrian, D. Grenier et al. 2006; Belibasakis 2012; Ho, Chen et al. 2015; Sakanaka, Takeuchi et al. 2016).

Quando existe um grande número de bactérias o processo de invasão celular ocorre em cerca de 20 minutos (E. Andrian, D. Grenier et al. 2006).

Processamento intracelular

Após a entrada na célula, as bactérias estão localizadas em endossomas primários e a partir daí podem seguir por várias vias. Algumas bactérias percorrem as vias normais de degradação intracelular através de endossomas tardios e posteriores lisossomas para degradação ou resultando da união de lisossomas com autofagossomas sendo degradados em autolisossomas. Contudo, grande parte das bactérias consegue escapar a estes meios de proteção das células e tomam uma via de reciclagem onde conseguem proliferar de modo a infetarem outras células (Figura 16).

Saída

Quando a bactéria sai da célula infetada vai rapidamente invadir células vizinhas promovendo assim a persistência da infeção dos tecidos mesmo sem causar a morte às células infetadas (Belibasakis 2012; Sakanaka, Takeuchi et al. 2016).

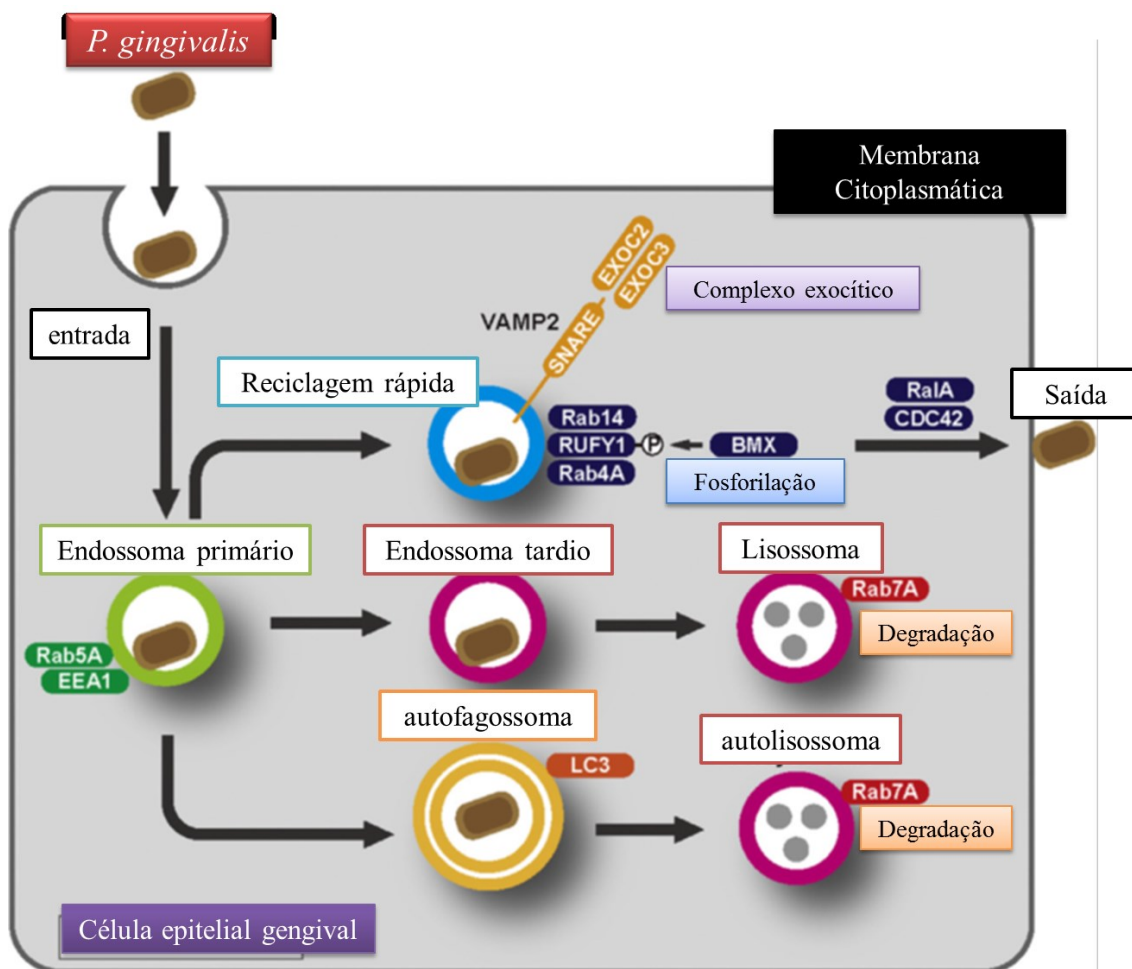


Figura 16 – Percurso intracelular de *P. gingivalis* [adaptado de (Sakanaka, Takeuchi et al. 2016)] – **Rab5A** é uma proteína localizada em endossomas primários responsável pelo recrutamento da proteína Rab7A e pela maturação em endossomas tardios; **EEA1** é uma proteína efetora de Rab5A e desempenha um papel importante no tráfico endossomal; **Rab7A** é uma proteína responsável pela endocitose, na formação e tráfico de vesículas; **VAMP2** pertence a um complexo proteico envolvido na ancoragem e/ou fusão de vesículas sinápticas com a membrana pré-sináptica; **Rab14** é uma proteína envolvida no tráfico de vesículas entre o complexo de Golgi e endossomas; **RUFY1** é uma proteína envolvida no tráfico endossomal primário; **Rab4A** é uma proteína envolvida na triagem e reciclagem de endossomas primários; **BMX** é uma enzima de ligação a RUFY1; **RaIA** é uma proteína que se liga à subunidade ribossomal 30S e induz uma fase estacionária na translação; **CDC42** é uma proteína que regula vias de sinalização que controlam diversas funções celulares como a morfologia celular, a migração, a endocitose e a progressão do ciclo celular; **LC3** é uma proteína presente em Auto fagossomas e reflete a atividade autofágica; **EXOC2**, **EXOC3** e **SNARE** são proteínas constituintes do complexo exocítico responsáveis pelo direcionamento de vesículas polarizadas para locais de ligação específicos na membrana citoplasmática [adaptado de NCBI (National Center for Biotechnology Information)]

Aquisição de nutrientes

A *P. gingivalis* necessita de recorrer a moléculas que se encontram no meio ambiente e que são metabolizadas e transformadas sucessivas vezes com o objetivo de obter energia. Esta bactéria é capaz de metabolizar uma variedade de aminoácidos gerando diversos produtos tóxicos como o propionato, butirato, isobutirato, isovalerato de etila etanol e butanol que contribuem para o desenvolvimento da periodontite (Nelson, Fleischmann et al. 2003).

A análise genómica desta bactéria revela que a glucocinase é codificada por uma fração de genes com uma mutação missense justificando a pobre utilização de glucose como fonte de energia. A metabolização de outros açúcares como a galactose, amido, maltodextrina e melibiose pode ocorrer. A degradação de tecidos do hospedeiro bem como os produtos resultantes do metabolismo de outras bactérias presentes na cavidade oral (simbiose metabólica) servem também como substratos para a produção de energia por parte da *P. gingivalis*. Destas fontes já foram identificados pelo menos 11 aminoácidos utilizados pela bactéria (Nelson, Fleischmann et al. 2003).

Um exemplo de simbiose metabólica é a verificada entre *P. gingivalis* e *T. denticola*, ambas do complexo vermelho. Existem interações de competição e cooperação entre estas bactérias resultando na sustentabilidade das duas espécies (Tan, Seers et al. 2014). A regulação e expressão genética de cada uma das bactérias, quando em co-cultura, é modificada, ditando a inibição de genes que codificam para proteínas responsáveis pelo armazenamento de ferro, aquisição do grupo “heme” e tioredoxina, em alterações no catabolismo do glutamato e glicina por parte da *T. denticola* e síntese de ácidos gordos e tiamina pirofosfato por parte da *P. gingivalis*. Isto sugere que há metabolitos que podem ser produzidos por cada uma das espécies permitindo a outra ignorar ou alterar processos metabólicos específicos.

O ferro (neste caso sob a forma do grupo heme) desempenha um papel importante na sobrevivência, crescimento e desenvolvimento das bactérias sendo cofator de múltiplas enzimas (ex. superóxido dismutase, peroxidase, catalase) e tem também um papel importante no stress oxidativo. Como este ião na sua forma livre é tóxico para as células do hospedeiro, só se encontra ligado a outras moléculas – maioritariamente na hemoglobina – sendo que as bactérias necessitam de desenvolver mecanismos complexos de extração e transporte do mesmo (Anaya-Bergman, He et al. 2010).

P. gingivalis não possui sideróforos (compostos quelantes de alta afinidade para íons ferro (Fe^{3+}) presentes em microrganismos onde o ferro é essencial no seu metabolismo [adaptado de (Neilands 1995)]) na sua composição mas possui outro tipo de recetores do ferro na sua membrana externa bem como proteases e lipoproteínas que ajudam a captar estas moléculas. O ambiente predileto desta bactéria está muitas vezes sujeito a condições de inflamação e hemorragia o que nos leva a deduzir que elevadas concentrações de ferro subgengival predisõem a acumulação desta bactéria nessa mesma área (C. Anaya-Bergman, A. Rosato et al. 2014; Mysak, Podzimek et al. 2014).

Para além do grupo heme, os íons de ferro inorgânico, transferrina e lactoferrina podem ser utilizados como fonte de ferro através de vários mecanismos presentes na bactéria (C. Anaya-Bergman, A. Rosato et al. 2014).

O ferro tem grande importância na regulação genética de determinadas vias de controlo de expressão de diversas moléculas que atuam diretamente na degradação, metabolismo e transporte da própria molécula bem como na expressão de fatores de virulência da *P. gingivalis* e proteção contra o stress oxidativo. Existe um variado grupo de proteínas essenciais que são ferro-dependentes na sua constituição (ex. oxidorecutases; citocromos; fumarato-redutases) (Anaya-Bergman, He et al. 2010; C. Anaya-Bergman, A. Rosato et al. 2014).

Mecanismos de defesa do hospedeiro

Na cavidade oral existe uma relativa estabilidade entre as bactérias e os diversos sistemas que aí atuam. Diversas estruturas, como o tecido epitelial queratinizado/não queratinizado, esmalte, saliva, fluido gengival, funcionam como barreiras físicas e químicas à invasão de bactérias a tecidos mais profundos da cavidade oral.

A presença de quantidades normais de saliva na cavidade oral constitui um importante meio de controlo microbiano. Na sua constituição encontram-se diversas moléculas que são responsáveis pela agregação bacteriana inibindo a sua adesão à superfície dentária – mucinas; e outras moléculas de modulação da microbiota oral – lactoferrina (muito importante como agente antimicrobiano, antiviral, antioxidante, imunomodulador, modulador do crescimento celular e marcador de severidade de periodontite), aglutininas, lisosima, peroxidases, histatinas, mucinas e defensinas (Vitorino 2015).

Na cavidade oral existe um espaço, entre o dente e a gengiva (sulco gengival) que apesar de conter células polimorfonucleares, sistema de complemento e anticorpos IgG e IgM facilmente é colonizado por bactérias. O sulco gengival contém normalmente cerca de $2,7 \times 10^{11}$ bactérias/g sendo 75% anaeróbias. Quando se criam condições e existem desequilíbrios nesse subsistema as bactérias periodontopatogénicas proliferam (Goering et al. 2013).

Quando deixa de existir a relativa estabilidade microbiológica no meio oral, a primeira linha de defesa contra a infeção corresponde à imunidade inata do hospedeiro. Esta é constituída por células fagocíticas (macrófagos, monócitos e neutrófilos), células natural killer (NK) e células dendríticas. Funcionam primariamente através de recetores de reconhecimento de padrões (**PPR**) como por exemplo recetores do tipo *toll* - **TLR** (toll-like receptors) existentes na superfície de diversas células do hospedeiro que reconhecem moléculas presentes nas bactérias denominadas de **PAMPS** - *Pathogen Associated Molecular Patterns* (ex. lipopolissacáridos, peptidoglicano, lipoproteínas, DNA e RNA bacteriano) (Tabela 3) (Barroso, H. et al. 2014)(Hans and Hans 2011; Vitorino 2015; Olsen and Yilmaz 2016).

Como se viu anteriormente, a estimulação dos TLR pelos elementos bacterianos vai resultar na libertação de um conjunto de citocinas que vão ser responsáveis pela sinalização celular e pela quimiotaxia de outras células do sistema imune como os neutrófilos e as células fagocíticas, com o objetivo final de matar as bactérias e restabelecer a saúde oral. Quando o estímulo é crónico, a libertação crónica de citocinas pró-inflamatórias (ex. IL-1 α , IL-1 β , IL-6 e TNF) resulta na inflamação e destruição dos tecidos, incluindo o tecido ósseo dando origem à periodontite. (Hans and Hans 2011)

Ao longo dos anos já foram identificados 10 tipos de TLR que respondem a diferentes estruturas microbianas (Tabela 3). A expressão de citocinas como primeira linha de defesa é realizada em neutrófilos, macrófagos e células dendríticas, no entanto sabe-se que pode também ser realizada por células presentes nos tecidos periodontais tais como em células epiteliais, fibroblastos, osteoblastos, osteoclastos, endotélio e cimentoblastos (Tabela 4) (Hans and Hans 2011).

Tabela 3 – Recetores do tipo *toll* e os seus ligandos [adaptado (Hans and Hans 2011)]

Receptores do tipo <i>toll</i>	Ligando
TLR 1	Lipopéptidos triacil
TLR 2	Lipoproteína, peptidoglicano, ácido lipoteicóico, zymosan, <i>P. gingivalis</i> (LPS e <i>pilis</i> comuns) e <i>Capnocytophaga ochracea</i> (LPS)
TLR 3	Cadeias duplas de RNA e ácido poliinosínico-policitidílico
TLR 4	<i>Escherichia coli</i> (LPS), <i>Porphyromonas gingivalis</i> (LPS), <i>Agregatibacter actinomycetemcomitans</i> (LPS) e <i>Fusobacterium nucleatum</i> (LPS)
TLR 5	Flagelina
TLR 6	Peptidoglicano, ácido lipoteicóico, zymosan e lipopéptidos diacil
TLR 7	imidazoquinolina
TLR 8	Cadeia singular de RNA e imidazoquinolina
TLR 9	DNA bacteriano e nucleótido CpG
TLR 10	Não determinado

Tabela 4 – Células dos tecidos periodontais com TLR e suas funções [adaptado de (Hans and Hans 2011)]

Células Periodontais	Receptores do tipo <i>Toll</i>	Funções
Células epiteliais gengivais	TLR 2, 3, 4, 5, 6, 9	<input type="checkbox"/> Adesão e migração de leucócitos <input type="checkbox"/> Produção de IL-8 <input type="checkbox"/> Produção de metaloproteinases
Fibroblastos gengivais	TLR 2, 4, 9	<input type="checkbox"/> Produção de IL-8 e de outras citocinas pró-inflamatórias
Endotélio	TLR 1, 3, 4, 5	<input type="checkbox"/> Produção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias <input type="checkbox"/> Migração de células imunológicas para o sulco gengival
Osteoblastos	TLR 1, 4, 5, 6, 9	<input type="checkbox"/> Produção de IL-8, TNF- α e mediadores biológicos responsáveis pela reabsorção óssea <input type="checkbox"/> Expressão aumentada de RANKL
Osteoclastos	TLR 2, 4	<input type="checkbox"/> Aumento da actividade osteoclástica <input type="checkbox"/> Aumento da sobrevivência de osteoblastos
Cimentoblastos	TLR 2, 4	<input type="checkbox"/> Baixa regulação de RANKL
Fibroblastos do ligamento periodontal	TLR 2, 4	<input type="checkbox"/> Produção de citocinas pró-inflamatórias <input type="checkbox"/> Libertação de proteases com destruição tecidual

As células fagocíticas caracterizam-se pelo processo de fagocitose de bactérias extracelulares realizado quando os **TLR** das células imunitária reconhecem os **PAMP** existentes nos microrganismos. As moléculas de LPS e de ácido lipoteicoico presentes em bactérias gram negativas são reconhecidas pelo recetor **TLR4** enquanto o CpG-DNA de origem bacteriana é reconhecido por **TLR9** (Barroso, H. et al. 2014).

Ao longo dos anos tem sido sugerida o desenvolvimento de tolerância a bactérias e dos seus produtos por parte da mucosa oral resultando em mecanismos subjacentes tais como uma diminuição na expressão de **TLRs** e inibição da sinalização intracelular. No entanto estudos recentes indicam-nos, que em condições de equilíbrio, é necessário uma resposta de **TLRs** à microbiota comensal para manutenção da saúde oral (Hans and Hans 2011).

Relativamente à resposta imunológica inata, pode ainda ocorrer a ativação da via alternativa do complemento levando a uma exacerbação da resposta inflamatória através das anafilotoxinas **C3a**, **C4a** e **C5a**, resultando na migração de linfócitos e neutrófilos do sangue para os tecidos (Figura 13) (Barroso, H. et al. 2014).

***P. gingivalis* e neutrófilos**

As respostas locais à presença de bactérias periodontopatogénicas também envolvem a presença e o recrutamento de outras células que combatem diretamente essas bactérias. Dentro dessas células destacam-se os **neutrófilos** e os **monócitos/macrófagos** que constituem grande parte do infiltrado inflamatório que se cria no combate a uma infeção. A sua circulação é promovida por quimiotaxia e são essenciais na homeostase tecidual periodontal. Desempenham um papel importante na regulação das respostas imunes do hospedeiro bem como na secreção de citocinas pró-inflamatórias (N. Bostanci, R. Allaker et al. 2007; Olsen and Hajishengallis 2016).

Os neutrófilos circulam na corrente sanguínea de pequenos vasos e formam ligações fracas com as células endoteliais mediadas por ligações **PGLS:1-selectina P/E**. Perante um estímulo infeccioso ou inflamatório as selectinas são removidas e **integrinas $\beta 1/CD11$ e integrinas $\beta 2/CD18$** são estimuladas criando ligações fortes a moléculas de adesão intercelular 1 (**ICAM-1**) presentes nas células de revestimento endotelial dos vasos sanguíneos da mucosa oral promovendo a adesão e diapedese (Figura 17). Certas

quimiocinas e citocinas, como **IL-8**, são libertadas por células endoteliais e criam gradientes químicos que favorecem a quimiotaxia e a diapedese. Recetores TLR (**TLR2**, **TLR4**, **TLR5**) também são responsáveis pela adesão dos neutrófilos dependentes de integrinas (Olsen and Hajishengallis 2016).

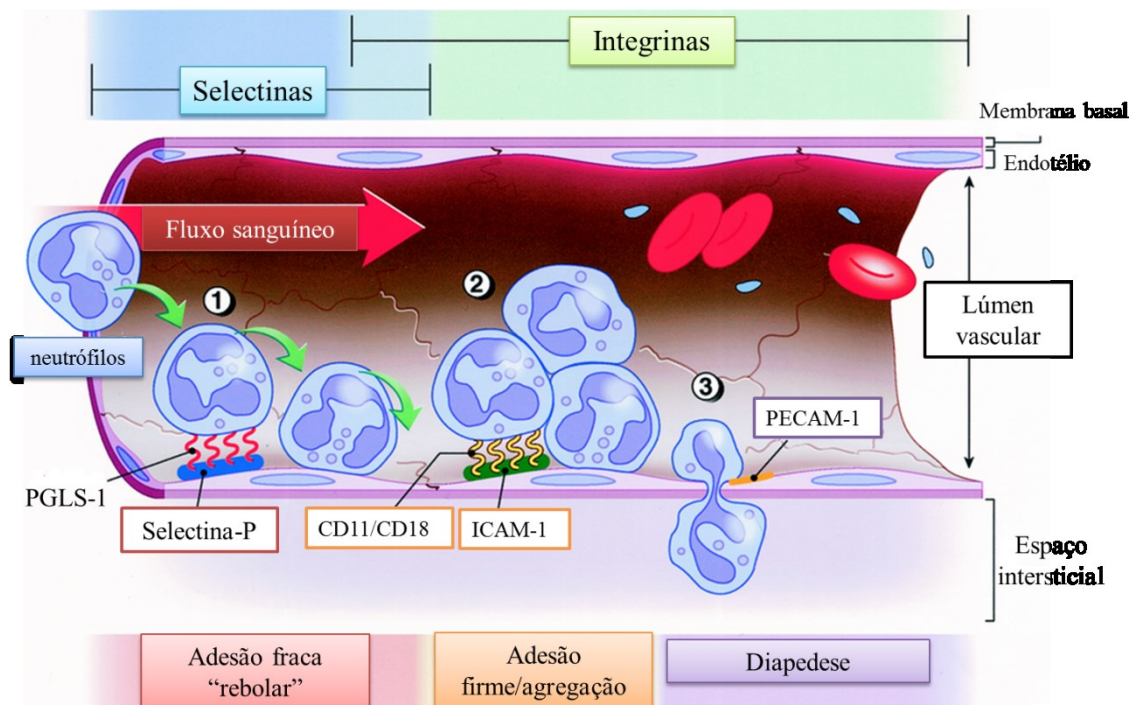


Figura 17 – Adesão de neutrófilos a células endoteliais e diapedese. PGLS-1 (glicoproteína selectina-P 1) é um recetor de selectinas presente em células endoteliais; PECAM-1 - molécula celular de adesão plaqueta-endotélio 1 facilitadora da diapedese nas junções de células endoteliais; ICAM-1 – molécula de adesão intercelular 1 presente em células endoteliais e responsável pela adesão de neutrófilos às mesmas; [adaptado de (Collard and Gelman 2001)]

Como ações preponderantes, estas células são responsáveis pela localização e fagocitose de microrganismos invasores, produção e libertação de enzimas com ação antimicrobiana – mieloperoxidase e enzimas proteolíticas – produção de grânulos com proteínas catiónicas (lisozima e lactoferrina) responsáveis pela degradação da membrana celular e libertação de produtos tóxicos resultantes da sua atividade – moléculas reativas de oxigénio como o superóxido que é convertido em peróxido de hidrogénio. Quando em grandes quantidades e em hiperatividade, estas células também

causam danos nos tecidos do hospedeiro (Vitorino 2015; Olsen and Hajishengallis 2016).

A *P. gingivalis*, sendo uma bactéria invasora, desenvolveu um conjunto de mecanismos responsáveis pela subversão das ações dos neutrófilos. Dentro dos mecanismos destaca-se interferência em ações como:

❖ **Recrutamento de neutrófilos / quimiotaxia**

P. gingivalis, provavelmente através do seu **LPS**, induz a redução na expressão de quimiocinas nos neutrófilos e de outras moléculas responsáveis pela quimiotaxia como **IL-8**, e responsáveis pela adesão e diapedese, como **ICAM-1** e **selectina-E** (Figura 17). (Hans and Hans 2011; Vitorino 2015; Olsen and Hajishengallis 2016).

❖ **Produção de IL-8**

P. gingivalis segrega uma enzima (**fosfatase SerB**) responsável pela inibição da ativação do factor de transcrição **NF-κB** fundamental na transdução e transcrição do gene **IL-8** e muitas outras proteínas. (Olsen and Hajishengallis 2016)

❖ **Capacidade de “matar”**

P. gingivalis possui a capacidade de inativar a catepsina G, elastase, factor promotor da permeabilidade bacteriana e defensinas o que lhe confere uma capacidade acrescida de resistência à morte. Diversos estudos verificaram a maior resistência de *P. gingivalis* à morte intracelular em neutrófilos obtidos em indivíduos com periodontite de progressão rápida em comparação com neutrófilos obtidos em indivíduos saudáveis. A capacidade de *P. gingivalis* em inativar péptidos antimicrobianos e enzimas granulares confere capacidade de resistência à bactéria. *P. gingivalis* tem ainda a capacidade de induzir ligações **C5aR:TLR2** que vão inibir a ação de neutrófilos sobre a *P. gingivalis* e outras bactérias (Olsen and Hajishengallis 2016).

❖ **Resposta antimicrobiana e inflamatória**

Como vimos anteriormente, *P. gingivalis* inibe a resposta antimicrobiana pela subversão da molécula **C5aR** (recetor do factor do complemento C5a) em leucócitos mas não inibe os seus efeitos pró-inflamatórios permitindo o desenvolvimento

descontrolado da microbiota oral tendo como resultado final a disbiose (Olsen and Hajishengallis 2016).

P. gingivalis promove uma resposta pró-inflamatória através de **C5a** (potente molécula efetora pró-inflamatória) resultante da capacidade de clivagem (por proteases de arginina) da molécula C5 da cascata do sistema de complemento (Olsen and Hajishengallis 2016).

❖ **Processamento bacteriano**

P. gingivalis possui a capacidade de reduzir a sua fagocitose pela inibição da produção de **IL-12p70** (produzido por células dendríticas, macrófagos e neutrófilos) que induz a ativação de macrófagos via **IFN γ** . A regulação de **IL-12p70** é inibida pela interação das *pilis* comuns com a molécula **CR3** (recetor do complemento 3) (Olsen and Hajishengallis 2016).

***Porphyromonas gingivalis* e a reabsorção óssea**

Na *P. gingivalis* o LPS constitui o factor de virulência mais preponderante para um estado final de doença e é classificado como um factor chave para a reabsorção patológica do osso alveolar característico da periodontite avançada (Gao, Wang et al. 2016).

O osso, no nosso organismo, é constituído por células responsáveis pela sua manutenção e por garantirem um estado de equilíbrio dinâmico que resulta em deposição de tecido ósseo por parte de osteoblastos e na reabsorção de tecido ósseo por parte de osteoclastos. Todas estas ações são reguladas por mecanismos intrínsecos que visam manter a qualidade e o volume ósseo adequados às necessidades. Doenças ósseas como a esclerose óssea, osteoporose e outras doenças resultam da regulação anormal da remodelação óssea em que a sua homeostasia é destruída (Gao, Wang et al. 2016).

Ao longo dos anos foram estudados os mecanismos e as moléculas responsáveis pela regulação do padrão ósseo sendo analisadas as moléculas de sinalização da família das tirosinas cinases. Os recetores **Eph** (erythropoietin-producing human hepatocellular receptors) fazem parte da família dos recetores das tirosinas cinases e são ativados pelos seus ligandos – as **efrinas**. A ligação **Eph:efrina** resulta numa sinalização bidirecional

tendo repercussões em diversos processos fisiológicos tais como nos vasos sanguíneos, na migração de células e no desenvolvimento do sistema nervoso. Estudos recentes verificaram que a transdução do sinal bidirecional induzido pela ligação **efrinaA2:EphA2** é responsável pela regulação da homeostasia óssea tendo um papel fundamental na reabsorção óssea (o recetor EphA2 é expresso em células precursoras de osteoclastos e em osteoblastos) (Gao, Wang et al. 2016).

Aichao Gao et al (2016), analisaram qual o efeito do LPS da bactéria *P. gingivalis* na expressão de **EphA2** em osteoblastos e osteoclastos e quais as suas consequências. Verificaram que o LPS desta bactéria estimula a expressão de **EphA2** atuando também na expressão de genes responsáveis pela regulação do ciclo ósseo (ex. *Sp7*; *ACP5*; *MMP9*), sendo a diferenciação em osteoclastos promovida e a diferenciação em osteoblastos inibida. Com estes resultados podemos verificar que existe uma relação entre *P. gingivalis* e a perda óssea associada à periodontite. Diversos estudos neste sentido ainda são relativamente recentes e apenas realizados em modelos animais e *in vitro* sendo portanto necessário mais investigação nomeadamente no próprio corpo humano.

Quando existe um estímulo patológico para com o hospedeiro e se instala um processo infeccioso descontrolado, o sistema imunológico do hospedeiro atua sobre esta disbiose através do recrutamento de neutrófilos para o local infetado – maioritariamente para o sulco gengival. Quando os neutrófilos provenientes do endotélio não conseguem controlar a infeção, esta progride por invasão celular em profundidade para o tecido conectivo, ativando outros mecanismos celulares imunológicos. Citocinas como **TNF**, **IL-1 β** e **IL-17** são secretadas por macrófagos, células dendríticas e linfócitos T com o objetivo da regulação e desenvolvimento de linfócitos Th (T-helper) contribuindo para o exacerbar da resposta inflamatória (Hajishengallis 2014). Por sua vez, a **IL-17** atua em neutrófilos, fibroblastos e osteoblastos resultando na libertação de quimiocinas **CXC** (fundamentais no recrutamento de neutrófilos em células endoteliais Del-1), espécies reativas ao oxigénio (**ROS**), metaloproteinases (**MMPs**) (todas estas responsáveis pela degradação dos tecidos gengivais) e ao aumento da expressão do ligando do recetor ativador do factor nuclear κ B (**RANKL**) em osteoblastos que leva à maturação de células precursoras de osteoclastos (**OCP**). Linfócitos B e T (especificamente **Th1** e **Th17**) também têm um papel importante no mecanismo de ativação de osteoclastos via **RANKL**. (Figura 18) (Hajishengallis 2014).

Em todo este processo também são sintetizadas moléculas com capacidades anti-inflamatórias tais como a citocina **IL-10** (sintetizada por linfócitos T), **INF γ** (sintetizada por linfócitos Th1), **IL-4** e **IL-13** (sintetizados por linfócitos Th2) que juntamente com a osteoprotegerina (**OPG**), que é um recetor solúvel que inibe a ligação de **RANKL** ao seu recetor nas células precursoras de osteoclastos (OCP) **RANK**, vão inibir a diferenciação de células precursoras de osteoclastos (**OCP**) em osteoclastos (**OCP**) em osteoclastos (Figura 18) (Hajishengallis 2014).

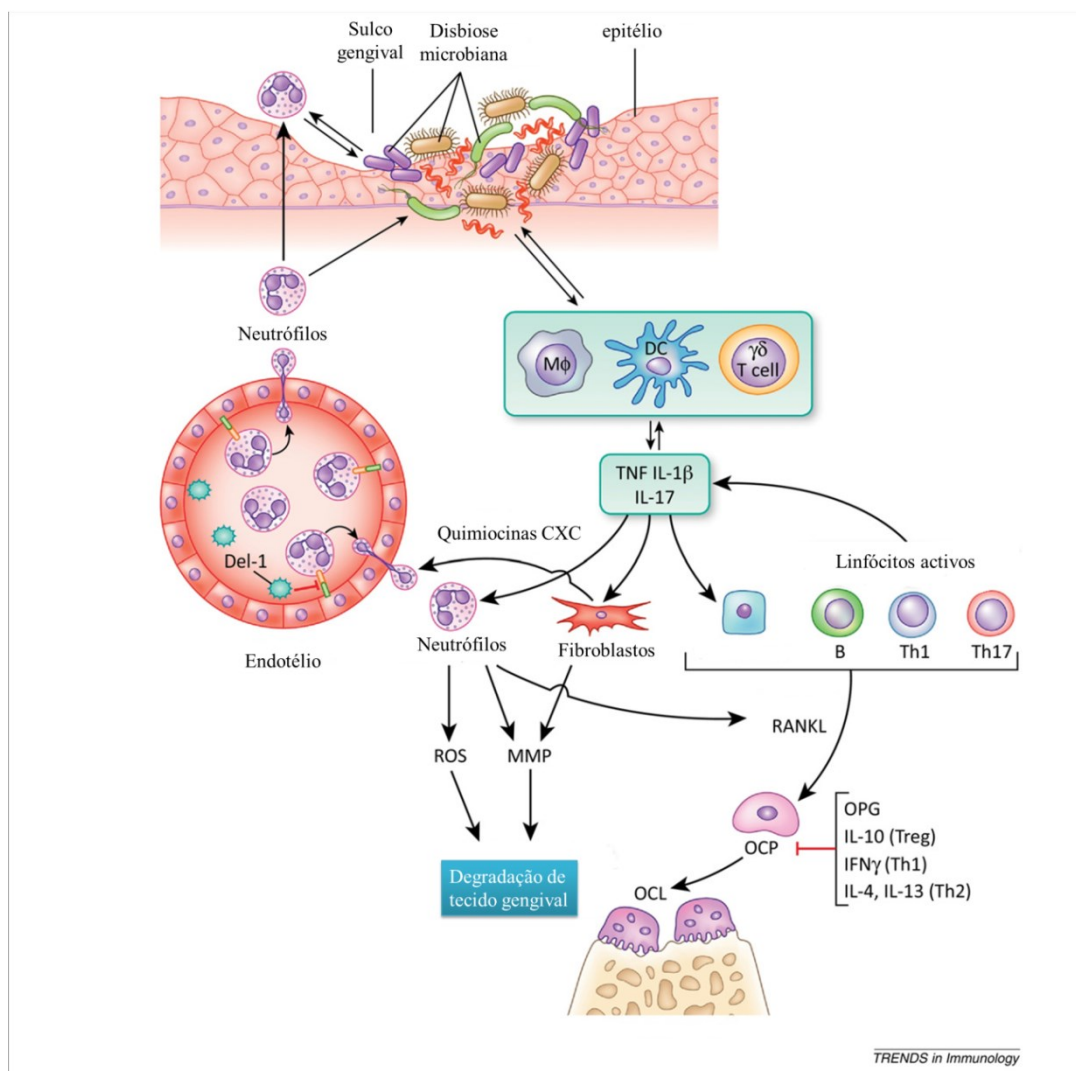


Figura 18 – Mecanismos inflamatórios que resultam em reabsorção óssea na periodontite [adaptado de (Hajishengallis 2014)]

Após se dar a destruição dos tecidos em redor do dente, especialmente do osso, apenas o ligamento periodontal possui na sua composição intrínseca capacidade de regeneração dos tecidos perdidos. O ligamento periodontal tem na sua constituição células pluripotentes com capacidade de regeneração dos tecidos em seu redor. As células do ligamento periodontal produzem proteínas constituintes do osso alveolar, estimulam a expressão de **fosfatase alcalina**, estimulam a produção de **colagénio tipo 1 α 1** e têm capacidade de mineralização por diferenciação osteoblástica. Muitos autores defendem que a terapia de regeneração tecidual periodontal usando células estaminais pluripotentes do ligamento periodontal vai ser importante no tratamento da periodontite (Kato, Taguchi et al. 2014).

Hirohito Kato et al (2014) estudou o efeito do **LPS** da *P. gingivalis* na diferenciação osteoblástica e mineralização em células estaminais do ligamento periodontal bem como a análise da produção de citocinas pró-inflamatórias (**IL-1 β** ; **IL-6**; **IL-8**) nessas mesmas células. Como resultados verificou-se um aumento da proliferação das células estaminais e da secreção das citocinas **IL-1 β** ; **IL-6**; **IL-8**. Por outro lado a capacidade de mineralização, a atividade da fosfatase alcalina, a libertação de osteocalcina e a produção de colagénio foram suprimidas pela LPS.

O **colagénio tipo 1**, produzido em fases iniciais da diferenciação de osteoblastos, é essencial para a formação de novo osso sendo que a **LPS** da *P. gingivalis* inibe a expressão de mRNA responsável pela sua produção em fibroblastos do ligamento periodontal (Kato, Taguchi et al. 2014).

A **fosfatase alcalina** é um marcador do fenótipo osteoblástico sendo secretada na fase intermédia da diferenciação de osteoblastos sendo que a LPS da *P. gingivalis* inibe a sua atividade em fibroblastos do ligamento periodontal, em células da polpa e em células mesenquimatosas da medula óssea (Kato, Taguchi et al. 2014).

A **osteocalcina** é uma proteína constituinte da matriz do osso sendo um marcador tardio da diferenciação osteoblástica. O **LPS** da *P. gingivalis* inibe a expressão de mRNA responsável pela produção desta proteína em fibroblastos do ligamento periodontal e em células mesenquimatosas da medula óssea em ratos (Kato, Taguchi et al. 2014).

A deposição de cálcio extracelular diminuída e o número reduzido de módulos mineralizados verificados na presença de **LPS** da *P. gingivalis* indicam-nos a

diminuição na diferenciação em osteoblastos maduros. As conclusões deste estudo foram que o **LPS** da *P. gingivalis* inibe a diferenciação osteoblástica bem como os processos de mineralização estimulando, por outro lado, a liberação de citocinas pró-inflamatórias em células estaminais do ligamento periodontal ajudando desta forma a esclarecer a relação entre a destruição periodontal e a regeneração periodontal (Kato, Taguchi et al. 2014).

As consequências ao nível ósseo na periodontite e na presença de *P. gingivalis* passam impreterivelmente pela ação das próprias células que o constituem. Verificamos que existem diversos mecanismos pelos quais os osteoblastos e os osteoclastos podem ser manipulados e regulados e que, pelo lado da bactéria existe uma grande variedade de estruturas que influenciam de diferentes formas o meio em que se encontram. Os estudos efetuados nesta área são feitos *in vitro* ou em modelos animais sendo necessário passar para o próximo nível de evidência científica e continuar a apostar no desenvolvimento desta área para compreender melhor os efeitos que esta bactéria, e outras como ela, têm no desenvolvimento da periodontite e de outras doenças.

***P. gingivalis* e as doenças cardiovasculares**

Como verificamos anteriormente, a *P. gingivalis*, têm a capacidade de invasão de variadas células sem induzir a sua morte celular conseguindo propagar-se de célula para célula. A sua capacidade de invasão não se limita às células epiteliais da cavidade oral, mas também a um conjunto de outras células – macrófagos, células endoteliais e células do músculo liso. Assim esta bactéria, potencia a sua atividade de invasão celular e de deslocação célula a célula para alcançar localizações anatómicas mais distantes (Hussain, Stover et al. 2015).

A placa aterosclerótica que se forma nos vasos sanguíneos, nomeadamente no endotélio, consiste num depósito de células inflamatórias e de lípidos que se vão acumulando com o tempo nas paredes arteriais, ou seja, consiste numa resposta inflamatória imunofibroproliferativa crónica onde existem danos ao nível das células endoteliais vasculares. Muitas espécies bacterianas e outros microrganismos já foram associados à formação e desenvolvimento de placas de ateroma, como por exemplo *Chlamydia*

pneumoniae, *Helicobacter pylori*, *Cytomegalovirus* (CMV) e HSV (Hussain, Stover et al. 2015; Szulc, Kustrzycki et al. 2015).

Devido à prevalência bastante alta da periodontite na população mundial e devido ao facto de ser uma doença com uma resposta inflamatória crónica, muitos estudos, desde 1989, debruçaram-se sobre o potencial impacto da *P. gingivalis* nas doenças cardiovasculares (Szulc, Kustrzycki et al. 2015).

Bactérias periodontopatogénicas, como a *P. gingivalis* já foram isoladas de amostras destas placas de ateroma recolhidas de ratos e de indivíduos. Outros estudos relacionam e confirmam a presença de biomarcadores de disfunção endotelial e dislipidémia com a periodontite (Hussain, Stover et al. 2015; Szulc, Kustrzycki et al. 2015).

Diversos autores como Evanthia Lala et al (2003) e Li Li et al (2002) avaliaram o início e a progressão da aterosclerose em ratos (Apo E negativo) infectados com *P. gingivalis* e ambos concluíram que a infeção desta bactéria na cavidade oral pode acelerar a formação e progressão da placa aterogénica (Li 2002; Lalla, Lamster et al. 2003; Szulc, Kustrzycki et al. 2015).

Num estudo realizado por Malgorzata Szulc et al (2015), estes autores concluem que bactérias periodontopatogénicas presentes nas bolsas periodontais conseguem progredir e atingir vasos sanguíneos e desta maneira consegue-se relacionar a periodontite como factor de risco da aterosclerose e doenças relacionadas.

A calcificação vascular e a proliferação e calcificação de células musculares lisas presentes nas paredes dos vasos sanguíneos constituem um factor de risco major no desenvolvimento de doenças cardiovasculares nomeadamente na aterosclerose. Liu G et al (2016) realizaram um estudo onde tentaram perceber se os lipopolissacáridos presentes na bactéria *P. gingivalis* estimulam ou não essa calcificação por efeito direto no tecido muscular liso. As conclusões obtidas foram de que esse factor de virulência afeta o fenótipo patogénico vascular bem como as células do músculo liso contribuindo para a calcificação vascular resultando noutro meio de prova da relação existente entre *P. gingivalis* – doença periodontal – aterosclerose (Hajishengallis, Darveau et al. 2012).

Outros estudos como o de Boxi Zhang et al (2016) confirmaram que outros fatores de virulência da bactéria *P. gingivalis*, como as *pilis* comuns e as proteases (mais especificamente Rgp – arginina), desempenham um papel fundamental na infecção de células musculares lisas (neste provenientes da artéria aorta) (Zhang, Sirsjo et al. 2016).

Uma molécula que contribui para a formação de placas de ateroma é a **anafilatoxina C5a** (resultante da clivagem do componente C5 do sistema de complemento por parte de proteases da bactéria) que está presente no local, promovendo a apoptose endotelial e de células do músculo liso induzindo também a expressão de metaloproteinases (**MMP1** e **MMP9**) em macrófagos (Hussain, Stover et al. 2015).

Em conclusão existe uma forte correlação entre a periodontite e as doenças cardiovasculares, mais especificamente a aterosclerose. Conclui-se que em indivíduos suscetíveis à periodontite existe com maior facilidade à proliferação de bactérias periodontopatogénicas – nomeadamente de *P. gingivalis* – que provocam reações imunológicas inflamatórias locais agudas. Com a cronicidade da doença, as bactérias proliferam para tecidos mais profundos e alcançam a corrente sanguínea viajando para locais distantes. Ao nível dos vasos sanguíneos, juntamente com outros fatores de risco (ex. obesidade, diabetes, dislipidémia) ocorrem em consequência um conjunto de ações que ditam o desenvolver das doenças cardiovasculares (Figura 19) (How, Song et al. 2016).

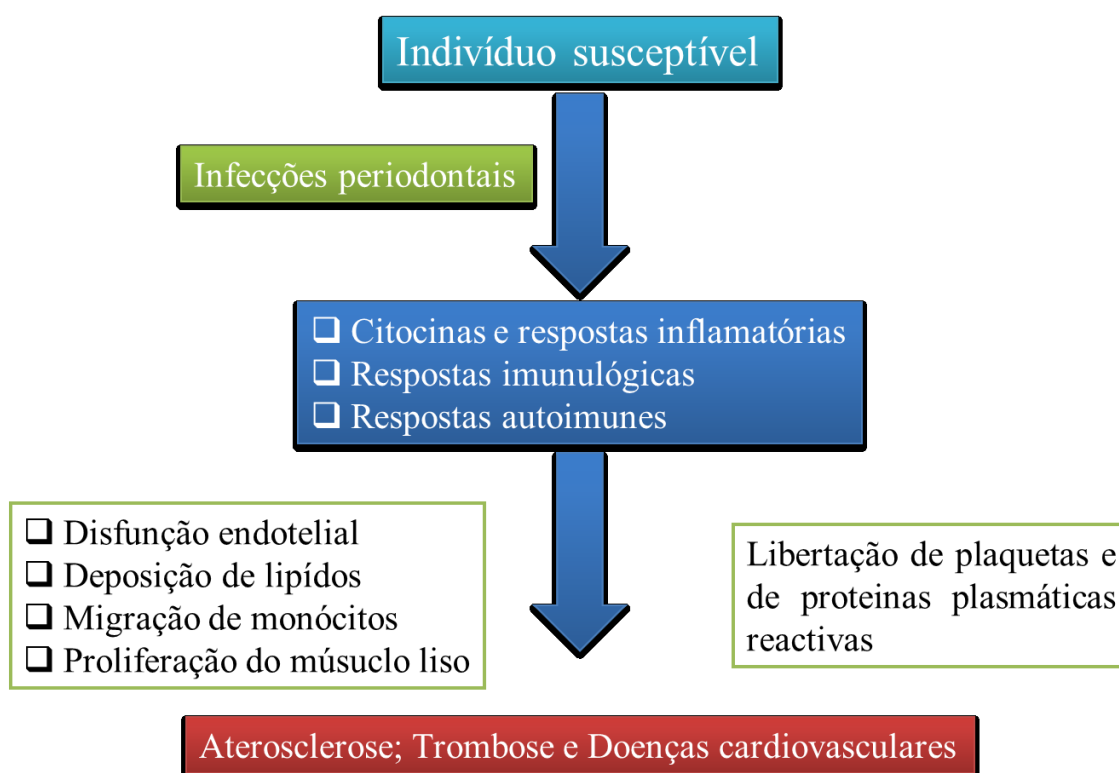


Figura 19 – Associação entre inflamação periodontal crônica e patogênese das doenças cardiovasculares [adaptado de (How, Song et al. 2016)]

O enfarte do miocárdio constitui a segunda maior causa de mortalidade em todo o mundo. Cerca de 80% têm uma etiologia isquêmica e os restantes 20% são de etiologia hemorrágica. Diversos estudos epidemiológicos têm verificado uma associação entre a periodontite e o enfarte do miocárdio isquémico. Num artigo de revisão sistemático e de meta-análise sobre a associação entre a periodontite e o enfarte isquémico, após a avaliação da qualidade metodológica de 414 artigos, apenas 8 artigos cumpriam os critérios de qualidade adotados pelos autores (sistema GRADE) (Leira, Seoane et al. 2016). Os 8 artigos foram conduzidos em 5 países diferentes, foram publicados entre 1996 e 2014, envolvendo amostras de população de 95 indivíduos a 9962 indivíduos. 3 artigos eram estudos de cohort e 5 eram casos-controlo. Verificou-se que apesar de em todos os estudos haver um diagnóstico de periodontite, não era obtido segundo todos os critérios necessários para o diagnóstico como a profundidade de sondagem, hemorragia à sondagem, perda de inserção clínica e imagem radiográfica compatível com reabsorção óssea. Após a análise destes 8 artigos os autores desta revisão concluíram haver uma associação positiva entre o enfarte isquémico e a prevalência de periodontite sendo que o risco de isquémia cerebral está aumentado em indivíduos com periodontite.

Referem que a inflamação pode desempenhar um papel fundamental no desenvolvimento da aterogénese e da fisiopatologia da isquémia cerebral e que ambas as doenças partilham um grande número de factores de risco como a idade, género, diabetes mellitus, hipertensão, hipercolesterolemia, índice de massa corporal (IMC) elevado, tabagismo e também o aumento sistémico de mediadores pró-inflamatórios, a estimulação do sistema imunitário inato e adaptativo podem levar a um aumento do potencial aterosclerótico. Verificaram ainda que níveis socioeconómicos baixos aumentam o risco do desenvolvimento da periodontite por falta de acesso a cuidados de saúde e por níveis de educação baixos. Apesar destas possíveis associações, estudos prospectivos bem concebidos devem ser realizados onde estejam bem explícitos os factores de risco vascular conjunto às doenças e todos os critérios diagnósticos restritivos da periodontite.

***P. gingivalis* e a artrite reumatoide**

A artrite reumatoide é uma doença inflamatória que afeta as articulações do corpo humano podendo causar alterações na membrana sinovial com destruição cartilágnea e óssea. Tem uma prevalência de 1% da população geral e uma incidência 2 vezes superior nas mulheres (Monteiro 2012).

Os mecanismos etiológicos e de iniciação da periodontite e da artrite reumatoide são diferentes, no entanto, diversos estudos clínicos e epidemiológicos sugerem a associação entre estas doenças com mecanismos patofisiológicos semelhantes caracterizados pela inflamação destrutiva. O tabagismo e a predisposição genética (presença do alelo *HLA-DRB1*) são factores de risco comuns entre a periodontite e a artrite reumatoide (Figura 20) (Koziel, Mydel et al. 2014). Joanna Koziel e seus colaboradores (2014) na sua revisão referem que em indivíduos com periodontite existe um maior risco de desenvolvimento de artrite reumatoide que em indivíduos saudáveis e vice-versa; que a periodontite é 2 vezes mais prevalente em indivíduos com artrite reumatoide e que a evolução da periodontite em indivíduos com artrite reumatoide é muito mais severa. Jose U. Scher e seus colaboradores (2013) referem que indivíduos com reatividade serológica contra *P. gingivalis* têm tendência a desenvolver uma maior atividade patológica associada à artrite reumatoide segundo os critérios DAS28

(“Disease Activity Score in 28 Joints”) e ICDA (“Clinical Disease Activity Index”) (Scher and Abramson 2013).

Como características das doenças temos a ativação de células inflamatórias, como as células **PMN**, e de citocinas pró-inflamatórias (**IL-1 β** , **IL-6**, **TNF- α** , **TNF- β**) que levam à erosão crônica do osso na artrite reumatoide e à destruição crônica periodontal na cavidade oral (Koziel, Mydel et al. 2014).

Na artrite reumatoide, indivíduos geneticamente suscetíveis caracterizam-se pela falta de tolerância a proteínas com aminoácidos de citrulina, geradas em condições fisiológicas, desencadeando uma resposta autoimune com a produção e liberação de autoanticorpos antiproteínas citrulinadas (ACPA) (Figura 20). A citrulinização de proteínas é essencial para muitos processos fisiológicos como na diferenciação terminal da epiderme, desenvolvimento do cérebro (proteína básica de mielina [MBP]) e na regulação da expressão de genes por remodelação da cromatina bem como em condições fisiopatológicas inflamatórias de necrose e apoptose. As enzimas **Peptidil Arginina Desaminases** (PAD), das quais foram identificadas 5 tipos (PAD1, PAD2, PAD3, PAD4 e PAD6) em humanos, é responsável pela citrulinização de proteínas e é ativada pelo influxo de cálcio em macrófagos que sofreram apoptose. A *P. gingivalis* é a única bactéria periodontopatogénica com a capacidade de expressar uma enzima PAD (Monteiro 2012; Koziel, Mydel et al. 2014; Mikuls, Payne et al. 2014).

Sheila L. Arvikar e os seus colaboradores (2013) estudaram as correlações clínicas de respostas de anticorpos a *P. gingivalis* em pacientes com artrite reumatoide. Para comparação foram testadas amostras de soro de pacientes com artrite reumatoide tardia, com artrite reumatoide inicial, de pacientes com outras doenças dos tecidos conjuntivos e de pacientes saudáveis. Respostas de anticorpos contra *P. gingivalis* em pacientes com artrite reumatoide inicial foram correlacionados com biomarcadores padrão de artrite reumatoide, medidas de atividade da doença e função. Como resultados 17 (34%) dos 50 pacientes com artrite reumatoide inicial tiveram resultados positivos para a presença de **IgG** contra *P. gingivalis*, 13 (30%) dos 43 pacientes com artrite reumatoide tardia apresentaram respostas de **IgG** contra *P. gingivalis*, valores significativamente elevados quando comparados com as amostras de pacientes saudáveis. Pacientes com artrite reumatoide têm tendência a ter respostas reativas de anticorpos maiores que pacientes com outras doenças dos tecidos conjuntivos. Estes autores concluíram que houve uma

tendência em direção a uma maior atividade da artrite reumatoide e uma maior disfunção funcional em pacientes com respostas positivas a anticorpos anti *P. gingivalis*. Estes resultados são consistentes de que a *P. gingivalis* desempenha um papel na patogénese da doença num subconjunto de pacientes com artrite reumatoide (Arvikar, Collier et al. 2013).

Em conclusão os estudos existentes sugerem que a infeção com *P. gingivalis* e a doença artrite reumatoide estão relacionadas, sendo esta bactéria um factor de risco na iniciação e manutenção da resposta inflamatória autoimune da artrite reumatoide (Koziel, Mydel et al. 2014). A favor desta tese a *P. gingivalis* expressa uma enzima PAD tendo impacto no desenvolvimento e progressão na artrite reumatoide via citrulinização de proteínas criando condições para a indução de autoanticorpos contra antígenos específicos da cartilagem do hospedeiro. A capacidade da *P. gingivalis* em ativar metaloproteínases (MMP) e o seu papel na regulação de respostas citocinicas também têm sido implicados na degradação proteica observada nas articulações nos casos de artrite reumatoide.

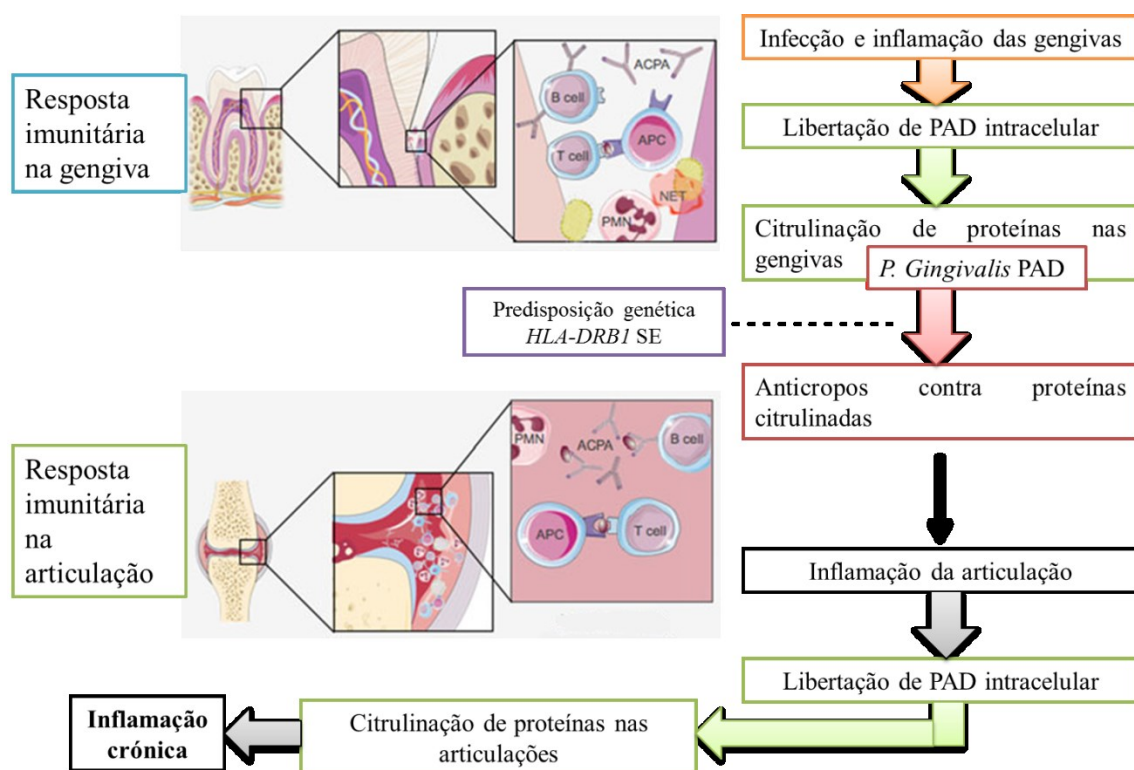


Figura 20 – Modelo da patogénese da periodontite na iniciação da artrite reumatoide. [Adaptado de (Koziel, Mydel et al. 2014)]

***P. gingivalis* e o Cancro**

Ao longo dos anos muitos investigadores têm-se debruçado sobre a associação entre certos tipos de microrganismos e várias formas de cancro orodigestivo. Na última década a associação entre *P. gingivalis* e o cancro tem sido sugerida tanto ao nível de tipos específicos de cancro, tendo sido mais associado com o **carcinoma de células escamosas na cavidade oral**, como ao nível de números estatísticos gerais de **cancro orodigestivo** (Katz, Onate et al. 2011). O carcinoma de células escamosas da cavidade oral é um dos mais comuns e mais mortais sendo diagnosticados cerca de 35.000 novos casos todos os anos e mais de 7.500 mortes por ano só nos Estados Unidos da América. Atualmente existe uma carência de ferramentas de diagnóstico para a identificação de pessoas de alto risco de desenvolverem carcinoma de células escamosas. A maioria dos casos, quando diagnosticados apresentam já metástases e a terapia disponível não evita a progressão da neoplasia. Todos estes fatores levam a que a investigação se debruce em procurar biomarcadores que identifiquem populações de risco, bem como no cuidado preventivo antes do desenvolvimento da carcinogénese (Atanasova and Yilmaz 2014).

Como vimos anteriormente a *P. gingivalis* inibe a morte das células do hospedeiro prolongando a sua sobrevivência e promovendo a sua proliferação. A adesão e invasão por parte da *P. gingivalis* a células epiteliais já foi confirmada *in vitro* sendo também sido associada a sua adesão a linhas celulares de carcinomas gengivais (Katz, Onate et al. 2011).

Num estudo realizado por Joseph Katz et al (2011) cujo objetivo era investigar a presença de *P. gingivalis* em 10 amostras de carcinoma de células escamosas da gengiva obtidas da divisão de patologia oral da universidade da Florida e de 5 amostras de indivíduos saudáveis, sendo a sua identificação feita por coloração das amostras com verde de metilo, foi verificado um aumento estatisticamente significativo de *P. gingivalis* nas amostras bem diferenciadas de carcinoma gengival comparando com as amostras controlo de tecido saudável onde foram encontradas em menor extensão. Apesar da amostra utilizada neste artigo ter sido baixa, este foi o primeiro a realçar uma verdadeira associação entre *P. gingivalis* com o carcinoma de células escamosas da cavidade oral. Os autores referem que foi provado histologicamente que a bactéria tem a capacidade de invasão tanto de células normais como de células neoplásicas [referido por (Atanasova and Yilmaz 2014; Zhang, Sirsjo et al. 2016)].

Num estudo de coorte de investigação prospectiva europeia onde Dominique S. Michaud et al (2012) mediram a presença de anticorpos contra 25 bactérias da cavidade oral em amostras de sangue de 405 doentes com **cancro pancreático** e 416 respetivos controlos, verificou-se que indivíduos com elevados níveis de anticorpos contra *P. gingivalis* tinham um risco 2 vezes mais elevado de desenvolverem cancro pancreático comparando com indivíduos com níveis mais baixos destes anticorpos. Concluiu-se que a periodontite pode aumentar o risco de cancro pancreático e que o aumento dos níveis de anticorpos contra bactérias comensais da cavidade oral pode inibir o crescimento de bactérias periodontopatogénicas e reduzir assim o risco de cancro pancreático. Futuros estudos são necessários para determinar se as bactérias da cavidade oral têm efeitos diretos sobre a patogénese do cancro do pâncreas ou mesmo servir como marcadores da resposta imune [referido por (Zhang, Sirsjo et al. 2016)].

Em relação ao **cancro pancreático**, outros autores referem que a enzima **PAD** produzida pela *P. gingivalis* pode ser responsável por mutações de arginina no **gene p53** verificado em pacientes com cancro pancreático (Öğrendik 2015).

No primeiro estudo a relacionar a bactéria *P. gingivalis* com o **cancro orodigestivo**, foi realizado sobre uma amostra de 12.605 indivíduos representativa da população dos Estados Unidos, por Jiyoung Ahn et al (2012), onde examinaram se a periodontite está associada à mortalidade do cancro orodigestivo tendo analisado a relação dos níveis de anticorpos séricos contra *P. gingivalis* com a mortalidade do cancro orodigestivo. Este estudo mostrou um risco aumentado da mortalidade do cancro orodigestivo em relação ao aumento da severidade da periodontite e relativamente a valores aumentados de **IgG** como biomarcadores de exposição a *P. gingivalis*. Indivíduos que não apresentam periodontite evidente demonstram ter em *P. gingivalis* um factor de risco independente na carcinogénese orodigestiva. É possível que a inflamação resultante da resposta imunológica a uma infeção e os seus produtos e toxinas associados podem desempenhar um papel importante na carcinogénese oral. Alternativamente as bactérias orais como *P. gingivalis* podem estar associadas ao metabolismo local de produtos cancerígenos como derivados do álcool e tabaco. Apesar de todas estas conclusões foi um estudo limitado na medida em que foi baseado na mortalidade em vez da incidência de casos de cancro orodigestivo tendo também sido realizado sobre uma amostra limitada de mortos por cancro orodigestivo limitando a avaliação dos riscos de mortalidade (Ahn, Segers et al. 2012).

Todos estes estudos referem a *P. gingivalis* como tendo um papel plausível na variedade de cancros orodigestivos descritos e permitem desenvolver no futuro novas teses sobre os mecanismos base das associações detetadas e obter respostas a essas perguntas através da análise de estudos *in vitro* com o objetivo final de encontrar novas formas terapêuticas não só para o tratamento do cancro mas também de biomarcadores, como por exemplo anticorpos contra *P. gingivalis*, para a prevenção e deteção precoce destes cancros (Atanasova and Yilmaz 2014).

Tratamento e Prevenção

Na cavidade oral, quando há um quadro de periodontite instalado, o objetivo principal do médico dentista é eliminar as bactérias e o tecido de granulação que se encontra associado à doença. Para isto, o tratamento padrão consiste no alisamento radicular em que usamos uma cureta afiada para remover o biofilme supra e infragengival associado à raiz e ao tecido epitelial. No entanto este tratamento tem limitações, nomeadamente em bolsas profundas (superiores a 5mm), dentes posteriores, requer a disponibilidade do paciente, depende da destreza do operador, nichos de bactérias podem permanecer na bolsa e não removem bactérias que invadem os tecidos do hospedeiro como é o caso da *P. gingivalis*. Com todas estas limitações foram desenvolvidas novas técnicas para uma mais eficiente eliminação do biofilme patogénico (Haag, Steiger-Ronay et al. 2015).

A **terapia fotodinâmica (PDT)** foi desenvolvida para eliminar bactérias sendo uma terapêutica não invasiva e que não causa danos nos tecidos do hospedeiro. Bactérias Gram positivas são mais suscetíveis uma vez que as suas paredes celulares são mais porosas e permeáveis. A terapia fotodinâmica consiste na ativação/excitação, por fotões a um comprimento de onda específico, de um fotossensibilizador (azul de metileno e azul de toluidina são os mais utilizados) que vai gerar radicais livres de oxigénio citotóxicos para os microrganismos e os seus produtos. A superfície celular das bactérias é bioquimicamente negativa sendo que fotossensibilizadores aniónicos não produzem efeito (Haag, Steiger-Ronay et al. 2015; Oruba, Labuz et al. 2015).

Philippe A. Haag et al (2015) realizaram um artigo de revisão com o objetivo de identificarem a literatura disponível sobre a eficácia antimicrobiana *in vitro* da terapia fotodinâmica sobre *P. gingivalis*, *A. Actinomycetemcomitans* e *F. nucleatum* sendo que

apenas selecionaram 6 artigos que cumpriam os critérios de exclusão (artigos que apenas usavam azul de metileno e azul de toluidina como fotossensibilizadores, estudos *in vitro*, tempo de irradiação de 60 segundos e realizados sobre as bactérias *P. gingivalis*, *A. Actinomycetemcomitans* e *F. nucleatum*). Dos 6 estudos apenas 4 incluíam a bactéria *P. gingivalis* onde usaram como fotossensibilizador o azul de toluidina e o azul de metileno e testaram diferentes fontes de luz como laser de diodo, lâmpadas LED e laser de Hélio-Neon. Como resultados foram obtidas percentagens de **90-100%** de redução do número de *P. gingivalis* em quase todas as amostras excepto quando usaram um laser de diodo com comprimento de onda de 830nm a uma potência de 100mW onde a percentagem de redução de *P. gingivalis* ficou-se pelos **57,97%**.

Recentemente Betsy J. et al (2014) realizaram um estudo clínico randomizado onde analisaram a eficácia da aplicação da terapia fotodinâmica como adjuvante de alisamentos radiculares em 90 pacientes com periodontite crónica obtendo diferenças significativas entre o grupo de teste onde se aplicou a terapia fotodinâmica e alisamentos radiculares com o grupo de controlo onde apenas se aplicaram os alisamentos radiculares. No grupo de teste, avaliações aos 3 meses e 6 meses mostraram uma redução estatisticamente significativa dos parâmetros clínicos “profundidade de sondagem” e “nível de inserção clínico” comparando com o grupo de controlo. Também os parâmetros “índice gengival” e “hemorragia à sondagem” mostraram melhorias significativas no grupo de teste às 2 semanas e 1 mês de controlo. No entanto o grupo de controlo mostrou maior sucesso quando comparado com o grupo de teste nos parâmetros “índice gengival” e “hemorragia à sondagem” aos 3 meses e “índice de placa” às 2 semanas. Estes autores concluíram que a terapia fotodinâmica associada ao tratamento periodontal convencional é benéfico a curto prazo mas que mais estudos são necessários para analisarem a eficácia a longo prazo desta terapia [referido por (Oruba, Labuz et al. 2015)].

Com estes estudos não podemos afirmar que esta técnica é comprovadamente a melhor no combate a infeções que levam à periodontite devido ao baixo número de estudos ainda realizados, sendo necessária a realização de mais estudos clínicos, podendo ser uma opção promissora como adjuvante às terapias convencionais.

Ao longo dos anos diversos investigadores confeccionaram e testaram vacinas de imunização contra *P. gingivalis* em ratos utilizando como antígenos células inteiras de *P. gingivalis* mortas bem como fatores de virulência individuais como proteases da bactéria. Em 2013 um grupo de investigadores testou em ratos com periodontite uma vacina de **peptidil arginina desaminase** (PAD) de *P. gingivalis* testando as respostas imunitárias e a análise da reabsorção óssea alveolar. Como referimos anteriormente esta enzima, produzida pela *P. gingivalis*, é responsável pela citrulinização de proteínas que regulam diversas vias de sinalização promovendo a destruição tecidual e a progressão da doença periodontal. Este estudo demonstrou pela primeira vez que ratos imunizados com **PAD** de *P. gingivalis* produzem anticorpos **Th2** (IgG1 e IgG2) dirigidos para o complexo PAD com proteção efetiva contra um genótipo específico de *P. gingivalis* testado (ATCC 33277) (Zhu, Yang et al. 2013). No entanto a *P. gingivalis* pode desencadear uma resposta latente de anticorpos contra proteínas citrulinadas podendo resultar na perda de auto-tolerância e no desenvolvimento de auto-imunidade no caso de artrite reumatoide. A utilização desta enzima tem de ser cuidada para evitar a citrulinização excessiva de proteínas do hospedeiro e para evitar o desenvolvimento de auto-imunidade.

Estes resultados mostraram não ser mais eficazes que os obtidos quando se utiliza a bactéria *P. gingivalis* inteira como antígeno na vacina. No entanto diversos autores defendem que devido à complexidade estrutural e bioquímica da *P. gingivalis* a vacina de células inteiras acarreta um risco de imunidade cruzada. Neste sentido devem ser testadas vacinas com estruturas individuais ou combinadas da *P. gingivalis* como antígenos para analisar os efeitos terapêuticos e preventivos na doença periodontal (Zhu, Yang et al. 2013).

Num estudo recente de Wilensky A. et al (2016), testaram uma vacina em ratos utilizando como antígeno uma **protéase de arginina** nativa e examinaram a imunização com um péptido recombinante de **RgpA** (proteases de arginina) na produção de anticorpos anti-*P. gingivalis* (IgG1 e IgG2) (Wilensky, Potempa et al. 2016). Os resultados demonstraram que a imunização de ratos com RgpA nativa levou à modificação de respostas imunológicas locais como a inibição da produção de **IL-1 β** , com capacidade de degradação de proteinases e indução da osteoclastogénese, e a estimulação de **IL-4** com propriedades anti-inflamatórias. Após a imunização com o péptido recombinante de **RgpA** verificou-se um aumento do número de anticorpos

IgG1 representativo de respostas linfocitárias **Th2** e também indutores da opsonização da *P. gingivalis* por parte de células **PMN**. A resposta anti-inflamatória local e de anticorpos **IgG1** conduzem à proteção contra a perda óssea alveolar induzida por *P. gingivalis*. Estes autores sugerem que o péptido recombinante de **RgpA** aqui utilizado pode ser um bom candidato para uma vacina na prevenção da periodontite induzida por *P. gingivalis*.

Outras terapias não convencionais para infecções por *P. gingivalis* podem ser testadas tais como o desenvolvimento de inibidores sintéticos específicos de fatores de virulência da *P. gingivalis*. Um exemplo corresponde ao inibidor desenvolvido por Curtis et al (2002) contra **Kgp** de *P. gingivalis* em que verificou uma redução significativa da patogenicidade da *P. gingivalis* pré-tratada com este inibidor e testada em ratos (Curtis, Aduse Opoku et al. 2002; Allaker and Ian Douglas 2015). Apesar dos resultados não demonstrarem alterações na ação de **Rgp** sabe-se que ambas as proteases em conjunto contribuem para a disrupção do sistema de complemento do hospedeiro e que assim, o desenvolvimento de uma agente inibidor de ambas as proteases teria um papel mais importante no potencial terapêutico na infecção. Recentemente Kataoka et al (2014) testou um inibidor dual (contra **Rgp** e **Kgp**) verificando uma potente, seletiva e eficaz atividade antibacteriana *in vitro* contra *P. gingivalis*, supressão da permeabilidade vascular em porcos bem como a redução da inflamação gengival em cães de raça beagle (Kataoka, Baba et al. 2014).

Podemos então concluir que os inibidores de proteases, mediante mais estudos de investigação, podem desempenhar um papel relevante enquanto agentes antimicrobianos no controlo da *P. gingivalis* com ações importantes em diversos mecanismos inflamatórios como a permeabilidade vascular e como adjuvante na terapêutica e prevenção da periodontite.

O desenvolvimento da **nanotecnologia** permitiu o fabrico e teste de partículas de tamanhos inferiores a 100nm com características favoráveis ao combate a infeções como superfícies ativas, reatividade química e biológica e uma maior capacidade de interação com as bactérias de igual para igual bem como a sua sinalização. A incorporação de metais, polímeros e de novas estruturas sintéticas nestas nanopartículas podem ser utilizadas como agentes antimicrobianos e utilizados como adjuvantes no controlo da formação de biofilmes na cavidade oral (Allaker and Ian Douglas 2015).

Megan S. Holden et al (2016) testaram a atividade antibacteriana de **nanopartículas parcialmente oxidadas de ouro e prata** (Ag/Au) contra *P. gingivalis* (Holden, Black et al. 2016). As bactérias *P. gingivalis* ao ficarem expostas a estas nanopartículas Ag/Au foram inibidas de crescer, no entanto verificaram que a capacidade antibacteriana destas partículas é potenciada pela presença de peróxido de hidrogénio que estimula a libertação do ião Ag^+ contribuindo para o stress oxidativo da *P. gingivalis*. Como vantagens das técnicas utilizadas por estes investigadores temos a capacidade de armazenamento a longo prazo das soluções nanoparticuladas de Ag/Au, uma maior janela terapêutica antimicrobiana e a minimização da toxicidade aguda de células do hospedeiro. Estudos *in vitro* e *in vivo* futuros são necessários para quantificar a eficiência e a citotoxicidade das nanopartículas de Ag/Au contra bactérias como *P. gingivalis*.

Conclusão

Os médicos dentistas, enquanto profissionais de saúde, necessitam compreender o estado de saúde tanto ao nível da cavidade oral como sistêmico e suas interações benéficas com microrganismos comensais. Só posteriormente se podem dedicar ao estudo de doenças e tentar perceber quais os intervenientes e mecanismos que as causam e de que maneiras podem atuar na sua prevenção e tratamento.

A periodontite e a cárie dentária são as doenças mais prevalentes da cavidade oral em todo o mundo sendo portanto as mais investigadas ao longo dos últimos anos. Nos fatores etiológicos da periodontite destacam-se as bactérias periodontopatogénicas que conseguem modular aos diversos mecanismos de defesa do hospedeiro causando estados infecciosos e inflamatórios locais e sistémicos.

Com este trabalho de revisão, tentei compreender qual a informação disponível acerca da bactéria *P. gingivalis* e de que modo esta está relacionada com a doença periodontal e com outras doenças sistémicas.

A periodontite é uma doença muito antiga, sendo claramente identificada em amostras humanas datadas de séculos atrás bem como as bactérias a ela associadas. A *P. gingivalis* é uma bactéria periodontopatogénica que, segundo os estudos epidemiológicos, tem uma prevalência baixa em casos de saúde oral mas que apresenta altos valores de prevalência em casos de periodontite sendo por estas razões, uma das principais bactérias associadas a esta doença.

Para que haja uma infeção oral de qualquer bactéria periodontopatogénica como de *P. gingivalis* é preciso que se criem condições ambientais favoráveis à sua proliferação uma vez que são bactérias anaeróbias e colonizadoras secundárias, ou seja, necessitam de outras bactérias para se desenvolverem. Para a criação destas condições basta que o indivíduo não faça uma correta higiene oral permitindo assim o desenvolvimento das bactérias constituintes do biofilme. Logo nesta etapa temos um meio de prevenção da maioria das patologias associadas a bactérias patogénicas da cavidade oral incluindo da periodontite e da *P. gingivalis*.

Após a infecção da cavidade oral por *P. gingivalis* diversos mecanismos do sistema imunitário são ativados para o combate a esta infecção criando um estado inflamatório local. *P. gingivalis*, enquanto bactéria patogénica, possui vários fatores de virulência que por um lado ativam determinados mecanismos pró-inflamatórios que vão ser benéficos para a bactéria e inativam outros para a sua proteção.

Como fatores de virulência principais destaco as proteases produzidas pela *P. gingivalis* que têm funções na conversão e degradação da hemoglobina, inibição do sistema de complemento, destruição de proteínas da matriz extracelular, proteólise de citocinas e imunoglobulinas, expressão de metaloproteinases, clivagem de recetores de linfócitos T e inibição da quimiotaxia de neutrófilos e diapedese. Destaco também os LPS e a sua subestrutura lípido A que são responsáveis pela modulação de vias de sinalização quer por estimulação ou inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias, diferenciação de linfócitos, quimiotaxia e diapedese de neutrófilos e estimulação da osteoclastogénese.

Esta capacidade de manipulação do sistema imunitário e de favorecer uma disbiose da microbiota da cavidade oral tem como objetivo a sua subsistência pela aquisição de novos nutrientes resultantes da morte de células do hospedeiro e de bactérias, e pelas necessidades de ferro proveniente maioritariamente da hemorragia associada à periodontite.

A reabsorção patológica do osso alveolar característica da periodontite é estimulada pela *P. gingivalis* que promove a diferenciação osteoclástica e inibe a diferenciação osteoblástica.

Como meio de proteção chave destaca-se a capacidade da *P. gingivalis* invadir células epiteliais gengivais manipulando os ciclos celulares das mesmas e inibindo a sua morte celular programada de maneira a proliferar intracelularmente escapando assim aos neutrófilos e às suas ações. A sua proliferação célula a célula pode levar a bactéria de *P. gingivalis* até à corrente sanguínea e assim espalhar-se pelo corpo criando nichos noutros locais, promovendo a inflamação e a doença a nível sistémico.

A presença de *P. gingivalis* juntamente com outros fatores de risco como a diabetes, obesidade e dislipidemia pode levar à criação de processos inflamatórios locais nos vasos sanguíneos onde existe uma invasão por *P. gingivalis* de células endoteliais, de células musculares lisas e acumulação da bactéria nesses locais resultando numa calcificação vascular e à formação de placas de ateroma.

A *P. gingivalis* foi associada à doença artrite reumatoide uma vez que tem a capacidade de síntese de enzimas peptidil arginina desaminases (PAD) responsáveis pela citrulinização de proteínas que, num hospedeiro geneticamente suscetível, são detetadas como moléculas antigénicas que devem ser combatidas pelo sistema imunitário. A *P. gingivalis* é um fator de risco na iniciação e manutenção da resposta inflamatória autoimune da artrite reumatoide.

Diversas bactérias da cavidade oral como a *P. gingivalis* foram identificadas em casos de cancros orodigestivos e diversos estudos tentaram compreender qual o papel destas na patogénese do cancro. Todos os estudos indicam que poderá haver alguma relação entre a *P. gingivalis* e os cancros orodigestivos no entanto futuros estudos são necessários para determinar se as bactérias da cavidade oral têm efeitos diretos sobre a patogénese do cancro ou mesmo servir como marcadores da resposta imune com vista ao tratamento e prevenção.

Como métodos de tratamento e prevenção da periodontite e da infeção por *P. gingivalis* temos em primeiro lugar a motivação para a higiene oral que impede a proliferação de bactérias periodontopatogénicas. Os alisamentos radiculares constituem o principal tratamento padrão para a eliminação mecânica das bactérias e dos seus produtos. No entanto estão a ser desenvolvidos e testados novos tratamentos que começam a dar frutos tais como a terapia fotodinâmica que já mostrou resultados promissores a curto prazo na eliminação de *P. gingivalis* em indivíduos com periodontite, a utilização de nanopartículas que funcionam como agentes antimicrobianos específicos no combate a infeções por *P. gingivalis* e a criação de vacinas onde se utilizam estruturas chave da *P. gingivalis* como antígenos de maneira a que o sistema imunitário reconheça imediatamente e combata eficazmente essas estruturas quando há uma infeção por *P. gingivalis*.

A diversidade genotípica verificada nas estruturas da *P. gingivalis* bem como a heterogeneidade de antígenos existentes dificultam a capacidade de arranjar um tratamento químico padrão no combate a infeções por esta bactéria, daí o facto do tratamento mecânico na periodontite ser o padrão. Mais estudos *in vitro* e *in vivo* são necessários para se compreender melhor os mecanismos desta bactéria bem como em relação aos novos tratamentos propostos que ainda são muito limitados em termos de literatura.

Bibliografia

- Ahn, J., S. Segers, et al. (2012). "Periodontal disease, Porphyromonas gingivalis serum antibody levels and orodigestive cancer mortality." Carcinogenesis **33**(5): 1055-1058.
- Allaker, R. P. and C. W. Ian Douglas (2015). "Non-conventional therapeutics for oral infections." Virulence **6**(3): 196-207.
- Amano, A., I. Nakagawa, et al. (2004). "Variations of Porphyromonas gingivalis fimbriae in relation to microbial pathogenesis." JPeriodont Res 2004; **39**; 136–142. Blackwell Munksgaard, 2004.
- Anaya-Bergman, C., J. He, et al. (2010). "Porphyromonas gingivalis ferrous iron transporter FeoB1 influences sensitivity to oxidative stress." Infection and immunity **78**(2): 688-696.
- Arvikar, S. L., D. S. Collier, et al. (2013). "Clinical correlations with Porphyromonas gingivalis antibody responses in patients with early rheumatoid arthritis." Arthritis Research & Therapy 2013, **15**:R109
- Atanasova, K. R. and O. Yilmaz (2014). "Looking in the Porphyromonas gingivalis cabinet of curiosities: the microbium, the host and cancer association." Molecular oral microbiology **29**(2): 55-66.
- Barroso, H., Silvestre, A.M., Taveira, N., Rodrigues, A., Duarte, A., ... Vaz, C.P. (2014). *Microbiologia médica 1*. 1ª edição Lisboa, Portugal: LIDEL
- Belibasakis, N. B. a. G. N. (2012). "Porphyromonas gingivalis: an invasive and evasive opportunistic oral pathogen."
- C. Anaya-Bergman, A. Rosato, et al. (2014). "Iron- and hemin-dependent gene expression of Porphyromonas gingivalis."
- Collard, C. D. and S. Gelman (2001). "Pathophysiology, Clinical Manifestations, and Prevention of Ischemia–Reperfusion Injury." Anesthesiology, V 94, No 6, Jun 2001.
- Curtis, M. A., J. Aduse Opoku, et al. (2002). "Attenuation of the Virulence of Porphyromonas gingivalis by Using a Specific Synthetic Kgp Protease Inhibitor." Infection and immunity **70**(12): 6968-6975.
- d'Empaire, G., M. T. Baer, et al. (2006). "The K1 serotype capsular polysaccharide of Porphyromonas gingivalis elicits chemokine production from murine macrophages that facilitates cell migration." Infection and immunity **74**(11): 6236-6243.

- Darveau, R. P., G. Hajishengallis, et al. (2012). "Porphyromonas gingivalis as a potential community activist for disease." Journal of dental research **91**(9): 816-820.
- Du, A., S. Zhao, et al. (2016). "MicroRNA expression profile of human periodontal ligament cells under the influence of Porphyromonas gingivalis LPS." Journal of cellular and molecular medicine.
- E. Andrian, D. Grenier, et al. (2006). "Porphyromonas gingivalis-Epithelial Cell Interactions in Periodontitis."
- E. Andrian, D. Grenier, et al. (2006). "Porphyromonas gingivalis-Epithelial Cell Interactions in Periodontitis." J Dent Res **85**(5):392-403.
- Farlex. (s.d.). *The Free Dictionary*. Consultado em Maio 20, 2016 em: <http://medical.dictionary.thefreedictionary.com/diapedesis>
- Furugen, R., H. Hayashida, et al. (2013). "Porphyromonas gingivalis and Escherichia coli lipopolysaccharide causes resistin release from neutrophils." Oral diseases **19**(5): 479-483.
- Gao, A., X. Wang, et al. (2016). "Effect of Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide (Pg-LPS) on the expression of EphA2 in osteoblasts and osteoclasts." In vitro cellular & developmental biology. Animal **52**(2): 228-234.
- Goering, R.V., Dockrell, H.M., Zuckerman, M., Roitt, I.M. e Chiodini, P.L. (2013). *Mims' medical Microbiology*. 5a edição. Londres, Reino Unido: Elsevier.
- Haag, P. A., V. Steiger-Ronay, et al. (2015). "The in Vitro Antimicrobial Efficacy of PDT against Periodontopathogenic Bacteria." International journal of molecular sciences **16**(11): 27327-27338.
- Hajishengallis, G. (2014). "Immunomicrobial pathogenesis of periodontitis: keystones, pathobionts, and host response." Trends in immunology **35**(1): 3-11.
- Hajishengallis, G., R. P. Darveau, et al. (2012). "The keystone-pathogen hypothesis." Nature reviews. Microbiology **10**(10): 717-725.
- Hamed, M., G. N. Belibasakis, et al. (2009). "Porphyromonas gingivalis culture supernatants differentially regulate interleukin-1beta and interleukin-18 in human monocytic cells." Cytokine **45**(2): 99-104.
- Hans, M. and V. M. Hans (2011). "Toll-like receptors and their dual role in periodontitis: a review." Journal of Oral Science **Vol. 53**: 263-271.
- Hiroshima, Y., M. Bando, et al. (2012). "Resistin in gingival crevicular fluid and induction of resistin release by Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide in human neutrophils." Journal of periodontal research **47**(5): 554-562.
- Ho, M. H., C. H. Chen, et al. (2015). "Functional Advantages of Porphyromonas gingivalis Vesicles." PloS one **10**(4): e0123448.

- Holden, M. S., J. Black, et al. (2016). "Antibacterial Activity of Partially Oxidized Ag/Au Nanoparticles against the Oral Pathogen *Porphyromonas gingivalis* W83." Journal of Nanomaterials **2016**: 1-11.
- How, K. Y., K. P. Song, et al. (2016). "Porphyromonas gingivalis: An Overview of Periodontopathic Pathogen below the Gum Line." Frontiers in microbiology **7**: 53.
- <http://www.inflammation.dk/iir/09inn/tlrsg.htm>. Consultado em Maio 27, 2017
- Hung, C.-C. (2015). "Porphyromonas Gingivalis - The Bacteria of Periodontitis." 28-32.
- Hussain, M., C. M. Stover, et al. (2015). "P. gingivalis in Periodontal Disease and Atherosclerosis - Scenes of Action for Antimicrobial Peptides and Complement." Frontiers in immunology **6**: 45.
- Kataoka, S., A. Baba, et al. (2014). "A novel, potent dual inhibitor of Arg-gingipains and Lys-gingipain as a promising agent for periodontal disease therapy." FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology **28**(8): 3564-3578.
- Kato, H., Y. Taguchi, et al. (2014). "Porphyromonas gingivalis LPS inhibits osteoblastic differentiation and promotes pro-inflammatory cytokine production in human periodontal ligament stem cells." Archives of oral biology **59**(2): 167-175.
- Katz, J., M. D. Onate, et al. (2011). "Presence of Porphyromonas gingivalis in gingival squamous cell carcinoma." International journal of oral science **3**(4): 209-215.
- Kolenbrander, P. E., R. J. Palmer, Jr., et al. (2010). "Oral multispecies biofilm development and the key role of cell-cell distance." Nature reviews. Microbiology **8**(7): 471-480.
- Koziel, J., P. Mydel, et al. (2014). "The link between periodontal disease and rheumatoid arthritis: an updated review." Current rheumatology reports **16**(3): 408.
- Laine, M. L., B. J. Appelmelk, et al. (1997). "Prevalence and Distribution of Six Capsular Serotypes of Porphyromonas gingivalis in Periodontitis Patients." Journal of dental research **76**(12): 1840-1844.
- Lalla, E., I. B. Lamster, et al. (2003). "Oral infection with a periodontal pathogen accelerates early atherosclerosis in apolipoprotein E-null mice." Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology **23**(8): 1405-1411.
- Leira, Y., J. Seoane, et al. (2016). "Association between periodontitis and ischemic stroke: a systematic review and meta-analysis." European journal of epidemiology.

- Li, L. (2002). "Porphyromonas gingivalis Infection Accelerates the Progression of Atherosclerosis in a Heterozygous Apolipoprotein E-Deficient Murine Model." Circulation **105**(7): 861-867.
- Madhusoodanan, J. (2016). "Ancient teeth reveal clues about microbiome evolution." PNAS **113**(21): 5764-5765.
- Maria Rosaria Gatto, Marco Montecchi, et al. (2014). "Prevalence of six periodontal pathogens in subgingival samples of Italian patients with chronic periodontitis."
- Mikuls, T. R., J. B. Payne, et al. (2014). "Periodontitis and Porphyromonas gingivalis in patients with rheumatoid arthritis." Arthritis & rheumatology **66**(5): 1090-1100.
- Monteiro, S. S. d. O. (2012). "Biomarcadores na Artrite Reumatóide inicial." (Tese de Mestrado). FMUP, Portugal
- Moreno Sandraa, C. A. (2013). "Functional differences of Porphyromonas gingivalis fimbriae in determining periodontal disease pathogenesis: a literature review."
- Mysak, J., S. Podzimek, et al. (2014). "Porphyromonas gingivalis: major periodontopathic pathogen overview." Journal of immunology research **2014**: 476068.
- National Center for Biotechnology Information (s.d.). Consultado em junho 24, 2016 em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- N. Bostanci, R. Allaker, et al. (2007). "Interleukin-1 α stimulation in monocytes by periodontal bacteria: antagonistic effects of Porphyromonas gingivalis."
- Neilands, J. B. (1995). "Siderophores: Structure and Function of Microbial Iron Transport Compounds."
- Nelson, K. E., R. D. Fleischmann, et al. (2003). "Complete Genome Sequence of the Oral Pathogenic Bacterium Porphyromonas gingivalis Strain W83." Journal of bacteriology **185**(18): 5591-5601.
- Ogawa, T. (2007). "Chemical structure and immunobiological activity of Porphyromonas gingivalis lipid A." Frontiers in Bioscience **12**(8-12): 3795.
- Öğrendik, M. (2015). "Oral bacteria in pancreatic cancer: mutagenesis of the p53 tumour suppressor gene." Int J Clin Exp Pathol **2015**;8(9):11835-11836.
- Olsen, I. and G. Hajishengallis (2016). "Major neutrophil functions subverted by Porphyromonas gingivalis." Journal of oral microbiology **8**: 30936.
- Olsen, I. and O. Yilmaz (2016). "Modulation of inflammasome activity by Porphyromonas gingivalis in periodontitis and associated systemic diseases." Journal of oral microbiology **8**: 30385.

- Oruba, Z., P. Labuz, et al. (2015). "Antimicrobial photodynamic therapy-A discovery originating from the pre-antibiotic era in a novel periodontal therapy." Photodiagnosis and photodynamic therapy **12**(4): 612-618.
- Periasamy, S. and P. E. Kolenbrander (2009). "Mutualistic biofilm communities develop with *Porphyromonas gingivalis* and initial, early, and late colonizers of enamel." Journal of bacteriology **191**(22): 6804-6811.
- Petersen, P. E. and H. Ogawa (2005). "Strengthening the Prevention of Periodontal Disease: The WHO Approach." J Periodontol **76**.
- Reife, R. A., S. R. Coats, et al. (2006). "Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide lipid A heterogeneity: differential activities of tetra- and penta-acylated lipid A structures on E-selectin expression and TLR4 recognition." Cellular microbiology **8**(5): 857-868.
- Richard J. Lamont, A. E.-S., Yoonsuk Park, Guy S. Cook, J. William Costerton and Donald R. Demuth (2002). "Role of the *Streptococcus gordonii* SspB protein in the development of *Porphyromonas gingivalis* biofilms on streptococcal substrates."
- Sakanaka, A., H. Takeuchi, et al. (2016). "Dual lifestyle of *Porphyromonas gingivalis* in biofilm and gingival cells." Microbial pathogenesis **94**: 42-47.
- Scher, J. U. and S. B. Abramson (2013). "Periodontal disease, *Porphyromonas gingivalis*, and rheumatoid arthritis: what triggers autoimmunity and clinical disease?" Arthritis Research & Therapy **2013**, 15:122
- Slideshare (s.d.) Consultado em Maio 30, 2017 em: <http://www.slideshare.net/guest08e813/complement06>
- Slocum, C., S. R. Coats, et al. (2014). "Distinct lipid a moieties contribute to pathogen-induced site-specific vascular inflammation." PLoS pathogens **10**(7): e1004215.
- Szulc, M., W. Kustrzycki, et al. (2015). "Presence of Periodontopathic Bacteria DNA in Atheromatous Plaques from Coronary and Carotid Arteries." BioMed research international **2015**: 825397.
- Tan, K. H., C. A. Seers, et al. (2014). "*Porphyromonas gingivalis* and *Treponema denticola* exhibit metabolic symbioses." PLoS pathogens **10**(3): e1003955.
- Tikoo, P., S. Gugnani, et al. (2015). "*Porphyromonas gingivalis* : Its virulence and vaccine." Journal of the International Clinical Dental Research Organization **7**(1): 51.
- Tomita, S., A. Komiya-Ito, et al. (2013). Prevalence of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* and *Tannerella forsythia* in Japanese patients with generalized chronic and aggressive periodontitis. Microbial pathogenesis. **61-62**: 11-15.
- Torrunguang, K., S. Jitpakdeebordin, et al. (2015). "*Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, and *Treponema denticola* / *Prevotella*

- intermedia Co-Infection Are Associated with Severe Periodontitis in a Thai Population." PloS one **10**(8): e0136646.
- Tribble, G. D., J. E. Kerr, et al. (2013). "Genetic diversity in the oral pathogen *Porphyromonas gingivalis*: molecular mechanisms and biological consequences." Future microbiology **8**(5): 607-620.
- Vernal, R., E. Diaz-Guerra, et al. (2014). "Distinct human T-lymphocyte responses triggered by *Porphyromonas gingivalis* capsular serotypes." Journal of clinical periodontology **41**(1): 19-30.
- Vitorino, J. T. L. (2015). "DOENÇAS PERIODONTAIS E SUA RELAÇÃO COM PATOLOGIA SISTÊMICA E FARMACOTERAPIA ASSOCIADA."(tese de mestrado). ISCSEM, Portugal
- Warinner, C., J. F. Rodrigues, et al. (2014). "Pathogens and host immunity in the ancient human oral cavity." Nature genetics **46**(4): 336-344.
- Wikipédia (s.d.). Consultado em Maio 30, 2017 em: https://pt.wikipedia.org/wiki/Sistema_complemento
- Wilensky, A., J. Potempa, et al. (2016). "Vaccination with recombinant RgpA peptide protects against *Porphyromonas gingivalis*-induced bone loss." Journal of periodontal research.
- Zhang, B., A. Sirsjo, et al. (2016). "Transcriptional profiling of human smooth muscle cells infected with gingipain and fimbriae mutants of *Porphyromonas gingivalis*." Scientific reports **6**: 21911.
- Zhou, Q., T. Desta, et al. (2005). "Cytokine profiling of macrophages exposed to *Porphyromonas gingivalis*, its lipopolysaccharide, or its FimA protein." Infection and immunity **73**(2): 935-943.
- Zhu, C., J. Yang, et al. (2013). "Induction of immune response and prevention of alveolar bone loss with recombinant *Porphyromonas gingivalis* peptidylarginine deiminase." Archives of oral biology **58**(12): 1777-1783.